

Aus der Medizinischen Klinik III Klinikum Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. W. Hiddemann

**Analyse molekularpathologischer Faktoren des EGFR-Signalwegs und ihre
Bedeutung als prädiktive Faktoren in der Behandlung des metastasierten
kolorektalen Karzinoms mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab
-Untersuchung der CIOX-Studie (AIO KRK-0104)-**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christine Kapaun

aus
Tschimkent/Kasachstan

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Volker Heinemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann

Prof. Dr. Michael Habs

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Sebastian Stintzing

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	9
3	Material und Methoden	11
3.1	Untersuchungsmaterial	11
3.2	CIOX-Studie	11
3.3	EGFR-Ligandenexpression in der Real-Time PCR	13
3.4	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung des EGFR-Gens	16
3.5	Längenbestimmung des CA-Repeats im Intron 1	17
3.6	PTEN-Expression in der Immunhistochemie	19
3.7	Statistische Analysen	21
4	Ergebnisse	22
4.1	Ansprechen und Überleben in der Gesamtpopulation	22
4.2	Amphiregulin- und Epiregulin-Expression und Ansprechen	23
4.3	EGFR-Genkopiezahl und Ansprechen	31

4.4	CA-Repeatlänge und Ansprechen	42
4.5	PTEN-Status und Ansprechen	45
4.6	Definition eines Scores für die Therapieentscheidung	47
5	Diskussion	50
5.1	Prädiktive Bedeutung der EGFR-Liganden für das Therapieansprechen . .	51
5.2	Einfluss der EGFR-Genkopiezahl auf das Ansprechen	54
5.3	Korrelation des CA-Repeats mit der Hauttoxizität	58
5.4	Einfluss der PTEN-Expression auf das Ansprechen	59
5.5	ORR-Wahrscheinlichkeit als Entscheidungs-Score	61
6	Zusammenfassung	63
7	Anhang	66
7.1	Veröffentlichungen	66
7.2	Materialien und Geräte	77
7.2.1	Allgemein verwendete Geräte	77
7.2.2	Expressionsbestimmung der EGFR-Liganden	78
7.2.3	FISH	79
7.2.4	Längenbestimmung des Intron 1-Polymorphismus	81
7.2.5	Immunhistochemie	84
7.3	Abkürzungsverzeichnis	87
8	Danksagungen	91

Literaturverzeichnis**92****Abbildungsverzeichnis****100**

1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist mit etwa 16% die zweithäufigste Krebserkrankung der westlichen Industrieländer [41]. Nach Angaben des Robert Koch-Instituts erkranken in Deutschland jährlich etwa 70.000 Menschen an Darmkrebs. Dabei ist der Anteil beider Geschlechter annähernd gleich. Die Inzidenz liegt bei 20 bis 40 Erkrankten pro 100.000 Einwohner und Jahr [3]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 69 Jahre bei Männern und 73 Jahre bei Frauen. In Deutschland sterben jährlich etwa 25.000 Menschen an den Folgen von Darmkrebs [23].

Zwei Drittel aller Darmkrebsfälle zählen zu den nicht-hereditären, sporadischen Karzinomen [3]. Diese entwickeln sich über mehrere Jahre aus einer Dysplasie heraus. Dabei sind 90% dieser Dysplasien Adenome. Etwa 25% aller Patienten weisen eine familiäre Belastung auf. Neben genetischen Faktoren und molekularen Veränderungen gehört der westliche Lebensstil mit

- Übergewicht,
- Bewegungsmangel,
- ballaststoffarmer und fettreicher Ernährung,
- dem Konsum von rotem Fleisch (Schwein, Rind, Lamm) sowie
- regelmäßigem Alkohol- und Tabakkonsum

zu den Risikofaktoren bei der Genese des Kolonkarzinoms. Aufgrund fehlender oder uncharakteristischer Frühsymptome bleibt die Erkrankung oft lange unerkannt. Etwa 20% der Kolorektalkarzinome sind bei Diagnosestellung bereits metastasiert (synchrone Metastasierung) [23]. Blutige Stühle und veränderte Stuhlgewohnheiten, vor allem in einem Alter ab 50 Jahren, sind wichtige Warnsignale. Eine Koloskopie ist derzeit die einzige sichere Diagnosemethode, die bei Patienten ab 55 Jahren als Vorsorgemaßnahme von den Krankenkassen übernommen wird.

Auch bei frühzeitiger Diagnosestellung kann nur etwa die Hälfte der Patienten mit Operation und adjuvanter Chemotherapie geheilt werden. 20-25% der Patienten entwickeln eine metachrone Metastasierung und bedürfen einer palliativen Chemotherapie [23].

Die Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

In den letzten Jahren gab es viele Fortschritte in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRK). Durch Kombination der Basistherapie aus 5-Fluorouracil und Folinsäure (FUFA) mit dem Topoisomerase I-Inhibitor Irinotecan (FOLFIRI) oder dem Platinderivat Oxaliplatin (FOLFOX) in der Erstlinienbehandlung konnte das mediane Überleben von 12 Monaten auf 18 bis 21 Monate gesteigert werden [12, 14]. Dabei haben sich beide Regime als gleichwertig erwiesen [10, 39]. Seit 2001 ist das orale Chemotherapeutikum Capecitabin für die Erstlinientherapie des mKRK in Europa zugelassen. Capecitabin ist eine rational synthetisierte Vorstufe von 5-Fluorouracil (5-FU), die erst in der Leber und den Tumorzellen in das zytostatisch aktive 5-FU umgewandelt wird. In zwei Studien zeigte sich, dass Capecitabin mit einer höheren Remissionsrate und geringerer Toxizität dem infusionalen FUFA-Regime nicht unterlegen ist [20, 40]. Capecitabin kann ebenfalls in Kombination mit Irinotecan (CAPIRI) oder Oxaliplatin (CAPOX) verabreicht werden.

Der Einsatz monoklonaler Antikörper in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Die Möglichkeit einer zielgerichteten, individualisierten Therapie eröffnete sich durch den

Einsatz monoklonaler Antikörper. Für die Therapie des mKRK sind neben Antikörpern gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) vor allem Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) von Bedeutung. EGFR ist eine ubiquitäre transmembrane Rezeptortyrosinkinase und aktiviert über verschiedene Signalkaskaden Proliferation, Migration, Invasion und DNS-Reparatur bzw. hemmt die Apoptose der Zellen [28, 44]. Im Tumorgewebe fördert die Aktivierung des EGF-Rezeptors das Wachstum und die Metastasierung und beeinflusst die Therapieempfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika [44]. Das EGFR-Gen, das den Rezeptor kodiert, ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert.

Die Aktivierung des Rezeptors geschieht durch Bindung seiner Liganden EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), TGF- α (transformierender Wachstumsfaktor α), Amphiregulin oder Epiregulin und führt zur Dimerisierung von EGFR-Monomeren und Autophosphorylierung der Tyrosinkinase. Der aktivierte EGFR steuert hauptsächlich fünf Signalwege, die ihrerseits miteinander vernetzt sind (siehe Abb. 1.1):

- KRAS-BRAF-MAPK Signalweg
(Kirsten Rat Sarcoma/RAS Associated Factor B/Mitogen Activated protein Kinase)
- PI3K-AKT-mTOR-PTEN Signalweg
(Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/AKR mouse Thymoma inducing/Mammalian Target of Rapamycin/Phosphatase and Tensin Homolog)
- JNK/STAT Signalweg
(Janus Kinase/Signal Transducer und Activator of Transcription)
- cSrc Signalweg
(Cellular Sarcoma inducing)
- PLC γ Signalweg
(Phospholipase C γ)

Für die Behandlung des mKRK sind in Deutschland derzeit zwei EGFR-Antikörper zugelassen. Neben dem voll-humanisierten IgG1-Antikörper Panitumumab kommt der mo-

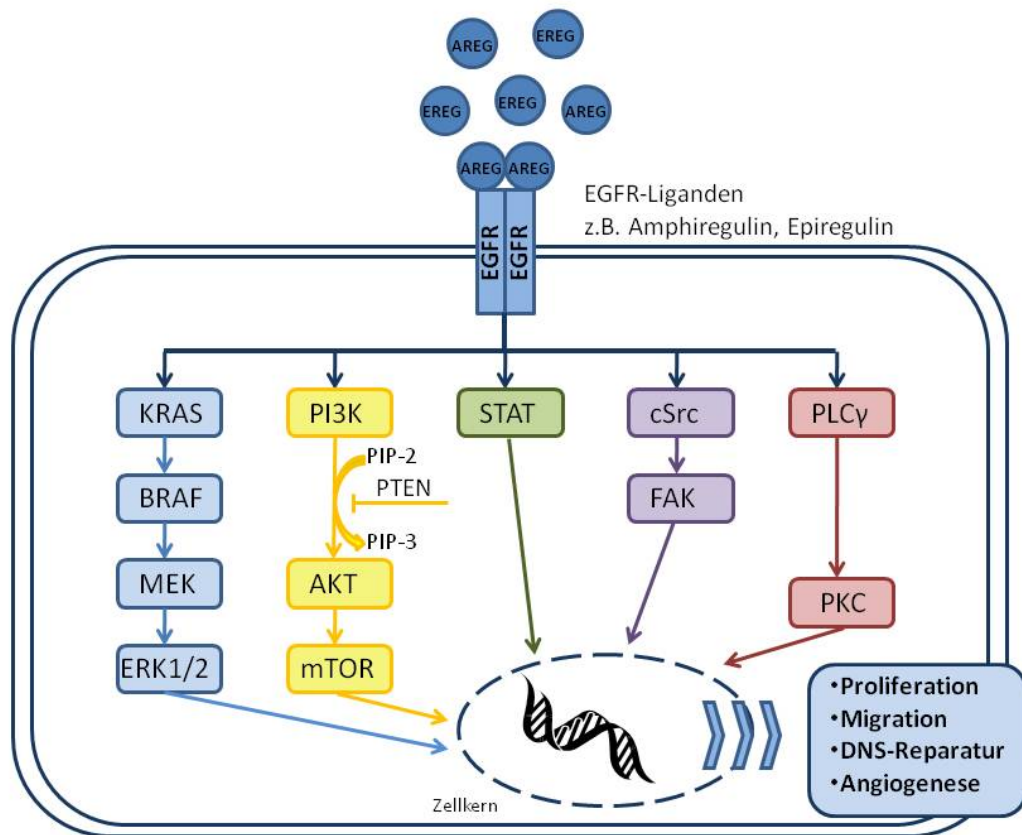


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der EGFR-Signaltransduktion

noklonale chimäre Maus/Mensch-IgG2-Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) zum Einsatz. Beide Antikörper binden an die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle und hemmen kompetitiv die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch seine Liganden [29]. Cetuximab ist sowohl in der Monotherapie als auch in Kombination mit FOLFOX oder FOLFIRI wirksam [6, 42]. Bei Irinotecan-refraktären Karzinomen kann Cetuximab die Chemosensitivität steigern [11]. Sowohl Cetuximab als auch seit Kurzem Panitumumab können in der Erstlinienbehandlung eingesetzt werden. Ziel der Therapie ist es, eine kurative Situation durch Resektion der Metastasen zu erreichen.

Die Suche nach geeigneten Markern für die Patientenselektion

Für die Behandlung des mKRK kann der Onkologe unter verschiedenen Substanzen wählen. Durch Hinzufügen von Antikörpern zur Chemotherapie ergeben sich viele Kombina-

tionsmöglichkeiten. Welches Therapieregime für den einzelnen Patienten das am besten geeignete ist, entschied sich bisher zum einen aus dem Nebenwirkungsprofil der Substanzen und den Vorerkrankungen des Patienten, zum anderen aus den persönlichen Erfahrungen des behandelnden Onkologen. Um das Therapieansprechen zu optimieren und die Toxizitäten möglichst gering zu halten, ist es notwendig, die Therapie durch Patientenselektion zu individualisieren.

Durch Identifikation bestimmter genetischer Faktoren scheint es möglich zu sein, Resistenzen oder Empfindlichkeit des Patienten gegenüber den EGFR-Antikörpern abzuschätzen. Um vor Therapiebeginn objektiv das Therapieregime mit der potentiell höchsten Wirksamkeit auswählen zu können, kann aus den genetischen Faktoren ein Patientenprofil erstellt werden. In der aktuellen Literatur werden derzeit mehrere möglicherweise relevante genetische Faktoren für die Antikörpertherapie mit Cetuximab diskutiert.

Die retrospektive Analyse der Zulassungsstudien für Cetuximab konnte bereits zeigen, dass Patienten mit Mutationen im Proto-Onkogen KRAS, welches das KRAS-Protein im KRAS-BRAF-MAPK Signalweg kodiert, eine Resistenz gegen den Antikörpern aufweisen [6, 42]. Durch diese KRAS-Mutationen ist die Tumorzelle in der Lage, den KRAS-BRAF-MAPK-Signalweg EGFR-unabhängig zu aktivieren und umgeht so die Hemmung des EGFR-Rezeptors durch Cetuximab. Solche Mutationen sind bei 35-40% der kolorektalen Karzinome zu finden [5, 43]. Vor Therapiebeginn mit Cetuximab muss deshalb eine KRAS-Mutationsanalyse durchgeführt werden, da EGFR-Antikörper nur für die Patienten zugelassen sind, deren Tumor einen KRAS-Wildtyp aufweist.

Aus der Subgruppe der KRAS-Wildtyp-Patienten profitierten wiederum nur 60% von der Antikörpertherapie [1], sodass sich die Frage nach weiteren möglichen prädiktiven Markern neben KRAS stellt, die für eine Patientenselektion herangezogen werden können.

Die Signaltransduktion im EGFR-Signalweg wird durch die Liganden des EGF-Rezeptor aktiviert. Neben EGF und TGF- α sind Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG) in der Lage, an den Rezeptor zu binden. Zu welchen Wechselwirkungen es zwischen Cetuximab und den Liganden kommt, ist bisher noch kaum bekannt. Die Gruppe um Khambata-Ford hat erstmalig die Expression dieser beiden Liganden untersucht und konnte bei Patienten mit mKRK in Zweit- oder Drittlinientherapie mit erhöhter Expression die Tendenz

zu besserem Ansprechen feststellen [24]. Diese Ergebnisse konnten von Tejpar et al. bestätigt werden, jedoch mit der Einschränkung auf Patienten ohne KRAS-Mutation [22]. Die Ergebnisse der beiden Gruppen sind hinweisend darauf, dass die Ligandenexpression gut geeignet ist, die bisherige Patientenselektion durch den KRAS-Status zu erweitern. In der Erstlinientherapie mit Cetuximab sind jedoch weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven notwendig, um AREG und EREG als prädiktive Faktoren zu etablieren. Voraussetzung für eine Anti-EGFR-Therapie ist die Expression des Rezeptors im Tumorgewebe. Diese lässt sich unter anderem mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) feststellen. Etwa 60-80% der Kolorektalkarzinome weisen eine EGFR-Expression auf [17]. Es ließ sich aber kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression und dem Therapieansprechen feststellen [9, 11, 36]. Bis zu 25% der Patienten, die in der IHC keine EGFR-Expression zeigten, sprachen trotzdem auf die Antikörper an [9, 15, 25]. Trotz der Empfehlung in der Cetuximab-Fachinformation scheint die immunhistochemische Bestimmung der EGFR-Expression für die Patientenselektion nicht geeignet zu sein.

Mit Hilfe der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) ist es möglich, die EGFR- Genkopiezahl (gene copy number, GCN) zu bestimmen. Bei der Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (non small cell lung cancer, NSCLC) mit Tyrosinkinaseinhibitoren (Gefitinib) konnte gezeigt werden, dass hohe EGFR-GCN mit einem besseren Ansprechen assoziiert sind [8, 19]. Aktuell durchgeführte Studien am mKRK zeigen ein uneinheitliches Bild bezüglich des Stellenwertes der EGFR-GCN als prädiktiver Faktor. Aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden (PCR, CISH, FISH) und inhomogener oder kleiner Patientenkollektive sind die Ergebnisse nicht vergleichbar [25, 26, 37, 38]. Weitere Daten sind notwendig, um die Wertigkeit der EGFR-GCN als Prädiktor des Therapieansprechens zu definieren.

Aktivierende Mutationen im EGFR-Gen spielen beim Bronchialkarzinom eine wichtige Rolle. Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Barber feststellen, dass EGFR-Mutationen beim mKRK sehr selten und für die Therapie nicht von Bedeutung sind [4]. Amador et al. konnten herausfinden, dass das Intron 1 des EGFR-Gens in Zusammenhang mit der EGFR-Expression steht [2]. Das Intron 1 besitzt eine polymorphe Region, die aus Wiederholungen des Dinukleotids CA (C für Nucleinbase Cytosin, A für Nucleinbase Ade-

nin) besteht. Dabei ist die Anzahl der CA-Wiederholungen (CA-Repeat) variabel. Längen zwischen 14 und 24 Wiederholungen wurden bereits beschrieben [2, 16, 21].

Bei Kopf-Hals-Tumoren, die mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib behandelt wurden, war eine niedrige Anzahl an CA-Repeats mit einer höheren EGFR-Expression und einem besseren Therapieansprechen verbunden [2]. Diese Ergebnisse konnten bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen, die mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib behandelt wurden, bestätigt werden [21]. Beim KRK konnte die Arbeitsgruppe um Amador jedoch nur einen Zusammenhang des Intron 1-Polymorphismus mit dem Auftreten des akneiformen Exanthems bei Therapie mit EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren feststellen. Das akneiforme Exanthem ist auch eine der häufigsten Nebenwirkungen einer Cetuximab-Therapie und ist mit einer besseren Prognose assoziiert. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Intron 1-Polymorphismus und dem Ansprechen auf die Therapie mit den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren konnte nicht nachgewiesen werden [21]. Zur Definition der Bedeutung des CA-Repeats beim mKRK wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt.

Neben dem KRAS-BRAF-MAPK-Signalweg ist der PI3K-AKT-mTOR-Weg ein weiterer durch EGFR gesteuerter Signalweg. Durch Aktivierung von PI3K wird aus PIP-2 (Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat) PIP-3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat) hergestellt, das wiederum AKT aktiviert und über mTOR die Apoptose der Zellen hemmt. Das Protein PTEN hemmt die Umwandlung von PIP-2 in PIP-3. Bei einem Verlust von PTEN (PTEN-loss) häuft sich PIP-3 in der Zelle an und kann so vermehrt über AKT und mTOR die Apoptose hemmen [13]. Ein Zusammenhang zwischen dem immunhistochemisch bestimmten PTEN-loss und einer Trastuzumab-Resistenz (Antikörper gegen den Her2/neu-Rezeptor, ein Mitglied der EGFR-Familie) konnte bereits beim Mammakarzinom nachgewiesen werden [32]. Die Auswirkungen des PTEN-Status wurden auch an einem kleinen Kollektiv von Patienten mit mKRK untersucht [15]. In diesen Untersuchungen hat keiner der Patienten mit PTEN-loss auf eine Kombinationstherapie mit Irinotecan und Cetuximab angesprochen. Loupakakis et al. haben den PTEN-Status bei primären Kolorektalkarzinomen und deren Metastasen erhoben. Ein Zusammenhang zwischen dem PTEN-Status und dem Ansprechen konnte nur bei den Metastasen hergestellt

werden. Ein Ansprechen des Primärtumors konnte durch PTEN nicht vorhergesagt werden [27]. Aufgrund dieser widersprüchlicher Ergebnisse sind noch weitere Untersuchungen zum PTEN-loss notwendig.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation weiterer molekulargenetischer Faktoren neben KRAS, die prädiktiv eine Aussage über das Therapieansprechen eines Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom bei Behandlung mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab erlauben. Es sollten Cut-off-Werte definiert werden, auf deren Grundlage die Entscheidung getroffen werden kann, ob die Therapie mit Cetuximab sinnvoll ist oder nicht. Aus diesem Grund wurden am Patientenkollektiv der CIOX-Studie, einer randomisierten Phase II Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit und Sicherheit von Capecitabin plus Irinotecan plus Cetuximab im Vergleich zu Capecitabin plus Oxaliplatin plus Cetuximab als Erstlinienbehandlung von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom, nachfolgende Faktoren untersucht.

- Die Expression der EGFR-Liganden Amphiregulin und Epiregulin mit Hilfe der absoluten Quantifizierung in der Real-Time PCR
- Die EGFR-Genkopiezahl mit Hilfe der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
- Die Länge des Intron 1-Polymorphismus des EGFR-Gens mit Hilfe der PCR, Fragmentlängenanalyse und Sequenzierung
- Die Expression des Tumorsuppressorgens PTEN auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistochemie

Der KRAS-Status der Patienten wurde im Rahmen anderer Voruntersuchungen bestimmt und bei der späteren Auswertung der hier gewonnenen Daten berücksichtigt.

Teile dieser Dissertation konnten im Rahmen einer Publikation im International Journal of Cancer und mehrerer Kongressmitteilungen veröffentlicht werden (siehe Anhang Kapitel 7.1). Weitere Publikationen stehen noch aus.

3 Material und Methoden

Alle verwendeten Reagenzien und Geräte sowie deren Hersteller und Bezugsquellen sind im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel 7.2).

3.1 Untersuchungsmaterial

Alle Untersuchungen wurden an Formalin-fixiertem in Paraffin eingebettetem Tumorgewebe (FFPE) durchgeführt. Das Gewebe stammt von Patienten mit histologisch gesichertem metastasierten kolorektalen Karzinom, die für eine Behandlung im Rahmen der CIOX-Studie (siehe Kapitel 3.2) eingeschlossen wurden. Vor Therapiebeginn wurden Biopsien oder Tumorresektate entnommen. Insgesamt standen 155 Tumorblöcke zur Verfügung. Davon enthielten 121 Blöcke OP-Resektate und 25 Blöcke Biopsien. Bei 9 Tumorblöcken war kein Tumorgewebe vorhanden.

Von allen Präparaten wurden je zwölf 3-4µm dicke Schnitte angefertigt (siehe Abb.3.1). Jeweils ein Schnitt wurde einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) nach einem Standardprotokoll unterzogen und einem Pathologen zur Beurteilung des Tumorareals vorgelegt.

3.2 CIOX-Studie

Die CIOX-Studie (AIO KRK-0104) war eine randomisierte Phase II Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit und Sicherheit von Capecitabin plus Irinotecan plus Cetuximab



Abb. 3.1: Beispiel für Präparate in der HE-Färbung mit markiertem Tumoreal

(CAPIRI/CET, Behandlungsarm A) im Vergleich zu Capecitabin plus Oxaliplatin plus Cetuximab (CAPOX/CET, Behandlungsarm B) in der Erstlinienbehandlung von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom. Im Zeitraum von September 2004 bis Dezember 2006 wurden an 35 Zentren 185 Patienten rekrutiert und in zwei Behandlungsarme randomisiert. Ein Therapiezyklus dauerte 21 Tage. Die Patienten in Arm A ($n=93$) erhielten $200\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche (KOF) Irinotecan i.v. an Tag 1 und $800\text{mg}/\text{m}^2$ KOF Capecitabin p.o. zweimal täglich an Tag 1 bis 14. Die Therapie in Arm B ($n=92$) bestand aus $130\text{mg}/\text{m}^2$ KOF Oxaliplatin i.v. an Tag 1 und $1000\text{mg}/\text{m}^2$ KOF Capecitabin p.o. zweimal täglich an Tag 1 bis 14. Alle Patienten erhielten zusätzlich $400\text{mg}/\text{m}^2$ KOF Cetuximab i.v. an Tag 1, gefolgt von wöchentlich $250\text{mg}/\text{m}^2$ KOF. Die Therapie wurde bis zur Progression oder bis zum Auftreten nicht tolerierbarer Nebenwirkungen fortgesetzt. Primärer Endpunkt der Studie war das Gesamtansprechen (overall response rate, ORR) gemessen als bestes Gesamtansprechen (best overall response, BOR) der Intention-to-treat-Population, beurteilt nach den RECIST-Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, Version 1.0). Sekundäre Endpunkte waren die Zeit bis zur Progression (time to progression, TTP), die Krankheitsstabilisierungsraten (disease control rate, DCR),

die Verträglichkeit und der Anteil der Patienten mit Grad 3- und Grad 4-Toxizitäten. Das Ansprechen wurde alle zwei Zyklen (entspricht 6 Wochen) mittels CT oder MRT evaluiert. Für die Effektivitätsbeurteilung standen zum ersten Staging noch 149 Patienten zur Verfügung. Die übrigen Patienten hatten entweder die Einverständniserklärung zurückgezogen, waren verstorben oder hatten schwere allergische Reaktionen auf die erste Cetuximab-Infusion. Ein positives Votum der Ethikkommission des Klinikums der Universität München (Projekt-Nummer 090/04) zur Untersuchung des Tumormaterials und eine vom Patienten unterschriebene Einverständniserklärung lagen vor Behandlungsbeginn vor.

3.3 EGFR-Ligandenexpression in der Real-Time PCR

Die Expression der EGFR-Liganden Amphiregulin (AREG) und Epiregulin (EREG) wurde auf RNS-Ebene untersucht. Dazu wurde die RNS der Proben isoliert und in komplementäre DNS (cDNA) umgewandelt. In einer Real-Time PCR wurde die cDNA vermehrt und deren Kopienzahl vermessen.

Die Methode der Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR ist es möglich, die absolute Kopienzahl der in der Probe eingesetzten Nucleinsäuresequenz zu bestimmen. Die amplifizierte Sequenz wird mit einem für die Sequenz spezifischen, fluoreszenzmarkierten Molekül (Universal Probe, Roche Applied Science, Mannheim) gekoppelt und vermehrt. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz detektiert. Der Zeitpunkt der ersten Signaldetektion einer Probe wird als crossing point bezeichnet (C_p) und ist proportional zur eingesetzten Kopienzahl der DNS. Zeitgleich zur Probenvermessung wird eine Standardreihe mit bekannten Kopienzahlen (10^2 bis 10^7 Kopien pro μ l) in der PCR vermehrt und auch deren C_p -Werte bestimmt. So lässt sich aus der bekannten Kopienzahl der Standardreihe und den gemessenen C_p -Werten die in den Proben eingesetzte Kopienzahl berechnen (siehe Abb. 3.2 und 3.3).

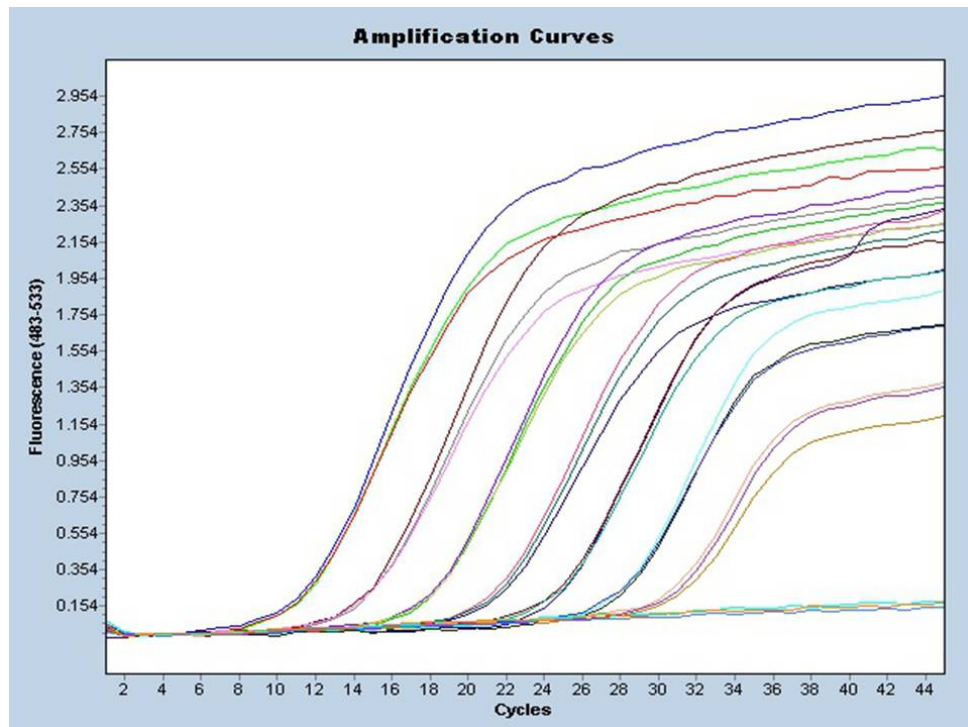


Abb. 3.2: Real-Time PCR: Amplifikationskurven des eingesetzten Standards
Abszisse: Anzahl der PCR-Zyklen; Ordinate: Stärke des Fluoreszenzsignals.

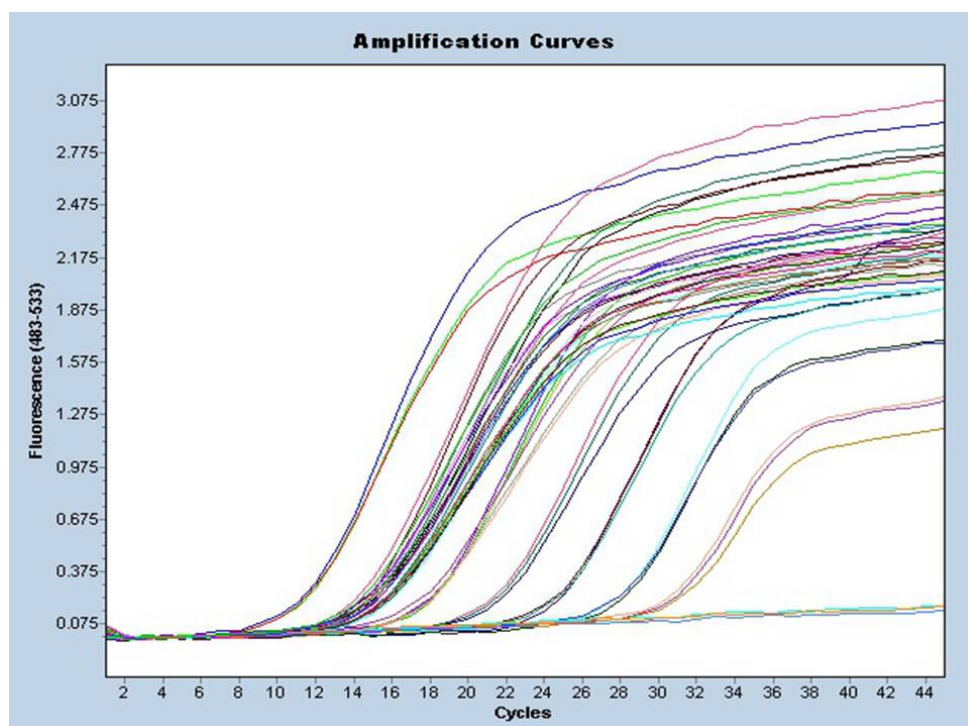


Abb. 3.3: Real-Time PCR: Amplifikationskurven des Standards zusammen mit den
untersuchten Tumorproben
Abszisse: Anzahl der PCR-Zyklen; Ordinate: Stärke des Fluoreszenzsignals.

RNS-Isolation und cDNA-Herstellung

Nach Entparaffinierung der Präparate in Xylol und Entfernung des Xylols durch Spülen in 100%igem Ethanol wurden die Schnitte luftgetrocknet. Diese Arbeitsschritte wurden unter einem Abzug durchgeführt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops wurde das Tumorareal per Hand mit einem Skalpell ausgekratzt und in eine Puffer-Lösung überführt. Aus dem Gewebe wurde die RNS unter Verwendung des RNeasy FFPE Kits (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers isoliert und gereinigt. Die RNS-Isolation basiert auf dem Prinzip der Säulenextraktion. Mit Hilfe einer Silicat-Membran in RNS-Bindungssäulchen wird die RNS gebunden, während alle kontaminierenden Substanzen ausgewaschen und abzentrifugiert werden. Die isolierte RNS wird dann in eine Pufferlösung überführt. Zuerst ist es jedoch notwendig, die im Gewebe enthaltene DNS unter Verwendung von DNasen (im Kit enthalten) aus dem Untersuchungsmaterial zu entfernen. Die isolierte RNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Weil für eine Amplifikation in der PCR nur DNS verwendet werden kann, wurde die isolierte RNS mit Hilfe der reversen Transkription in komplementäre DNS (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die hierbei hergestellte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Real-Time PCR-Durchführung und -Auswertung

Vor PCR-Durchführung wurde durch Kombination verschiedener Konzentrationen das optimale Konzentrationsverhältnis der verwendeten Primerpaare bestimmt. Die AREG- und EREG-Expression wurde mit der Expression der beiden Referenzgene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und β -Aktin verglichen. Die Real-Time PCR wurde mit Hilfe des Light Cycler 480 PCR-Geräts (Roche Applied Science, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Wegen geringer RNS- und damit cDNA-Ausbeute wurde nur ein 10 μ l-Ansatz mit 2 μ l cDNA eingesetzt. Es wurden 45 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C und einer Elongations-Temperatur von 72°C durchgeführt. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen.

Die gemessenen cDNA-Kopienzahlen aller Proben wurden auf 10ng/ μ l eingesetzter RNS normiert. Aus den Kopienzahlen beider Referenzgene wurde der Mittelwert gebildet, der

mit den AREG- und EREG-Werten der untersuchten Proben verrechnet wurde. Um die Nachkommastellen zu reduzieren, wurden alle Werte mit 1000 multipliziert. Drei epitheliale Zelllinien (CaCO2, SW480, LoVo) wurden als Positivkontrolle, drei mesenchymale (TC-71, SAOS-2, HT-1080) als Negativkontrolle verwendet. Es wurde versucht, die Reinheit des Tumorgewebes mit Hilfe der EpCAM-Expression (Epithelial Cellular Adhesion Molecule) abzuschätzen. Dazu wurde die EpCAM-Expression der Patientenproben mit der der Zelllinien verglichen.

Die Expression der beiden EGFR-Liganden wurde mit dem Ansprechen und Überleben der Patienten korreliert. Mit Hilfe einer ROC-Analyse (receiver operating characteristic) konnten für AREG und EREG Cut-off-Werte definiert werden, die am besten therapieempfindlichere von therapieresistenteren Patienten trennen.

3.4 Fluoreszenz in situ-Hybridisierung des EGFR-Gens

Zur Bestimmung der Genkopiezahl des EGFR-Gens wurde eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung nach dem Standardprotokoll des diagnostischen Labors des Pathologischen Instituts der LMU München durchgeführt. Nach einer Pepsin-Vorbehandlung und Denaturierung wurden die Präparate mit der EGFR-Sonde (Zytomed, Berlin) hybridisiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate in SSC-Puffer (sodium chloride, sodium citrate) und BT-Puffer (Bicarbonat-Tween 20) gewaschen und mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) gegengefärbt.

Die Auswertung wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Präparate wurden zunächst in der Übersicht bei 100-facher Vergrößerung und im Anschluss bei 630-facher Vergrößerung beurteilt. Die Bedientastatur MAC 500 (New York, USA) ermöglichte den Wechsel zwischen den verschiedenen Filtersystemen (Dualband Spectrum Green/ Spectrum Orange-Red HC-Filterset, Zytomed, Berlin). Das EGFR-Gen wurde mit einer spezifischen Sonde (ZyGreen, Zytomed, Berlin) hybridisiert,

die bei einer Anregung mit 503nm ein grünes Signal (528nm) aussendet. Die gegen die α -Satelliten-Sequenz des Zentromers von Chromosom 7 gerichtete Sonde (ZyOrange, Zytomed, Berlin) emittiert bei 547nm ein oranges Signal (572nm). In der DAPI-Einstellung konnten die Zellgrenzen beurteilt werden. Von repräsentativen Präparaten wurden zur Dokumentation Bilder angefertigt (AxioCam MRC, Zeiss, Oberkochen).

Bei jeweils 100 Tumorzellkernen in der Metaphase unterschiedlicher Lokalisationen wurden die Gen- und Zentromersignale ausgezählt und protokolliert. Von jedem Präparat wurde eine durchschnittliche Gen-Signalzahl (gene copy number, GCN) und das durchschnittliche Verhältnis von EGFR-Gen zu Chromosom 7 (EGFR/CEN7) berechnet. Die EGFR-GCN und das EGFR/CEN7-Verhältnis wurden mit dem Ansprechen und Überleben der Patienten verglichen. Dabei wurde die durchschnittliche Anzahl der EGFR-Genkopien und das EGFR/CEN7-Verhältnis jeweils als kontinuierliche Variablen benutzt und eine ROC-Analyse im Hinblick auf das Ansprechen durchgeführt.

3.5 Längenbestimmung des CA-Repeats im Intron 1

Für die Längenbestimmung des CA-Repeats im Intron 1 des EGFR-Gens wurde eine Fragmentlängenanalyse mit anschließender Sequenzierung der DNS-Sequenz des Intron 1 durchgeführt. Dazu wurde zunächst DNS aus dem Tumorgewebe isoliert.

DNS-Isolation

Nach Entparaffinierung der FFPE-Präparate in Xylol und Entfernung des Xylols durch Spülen in 100%igem Ethanol, wurden die Schnitte luftgetrocknet. Diese Arbeitsschritte wurden unter einem Abzug durchgeführt. Unter dem Lichtmikroskop wurde das Tumora-real per Hand mit einem Skalpell ausgekratzt und in eine Puffer-Lösung überführt. Die benötigte DNS wurde mit Hilfe des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits (Qiagen, Hilden) und unter Verwendung des automatischen Isoliergeräts QiaCube (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Isolation geschieht durch Bindung der DNS an eine Silikat-Membran in DNS-Bindungssäulchen, während alle kontaminierenden Substanzen

ausgewaschen und abzentrifugiert werden. Abweichend vom Handbuch wurde auf eine Denaturierung bei 96°C verzichtet, um die Ausbeute durch DNS-Zerstörung nicht zu verringern. Die gereinigte DNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

DNS-Amplifikation

Der interessierende Genabschnitt wurde nach dem Protokoll des diagnostischen Labors des Pathologischen Instituts der LMU (siehe Anhang, Tabelle 7.10) unter Verwendung des HotStarTaq DNA Polymerase Kits (Qiagen, Hilden) mittels PCR amplifiziert. Für die Fragmentlängenanalyse wurde ein farbstoffgekoppelter Primer (6-FAM, forward) verwendet. Der verwendete Primer-Mix aus den zwei benötigten Primern (forward und reverse) wurde aus jeweils 20µl der beiden Primer und 60µl RNase-freien Wassers hergestellt. Die beiden Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt (siehe Tabelle 7.9). Bei einer Annealing-Temperatur von 63,4°C wurden 40 Amplifikationszyklen durchlaufen. Die optimale Primerkonzentration, die Temperatur und die Anzahl der Zyklen wurden dabei in Vorversuchen ausgetestet.

Fragmentlängenanalyse und Sequenzierung

Bei der Fragmentlängenanalyse wird die Länge einer DNS-Sequenz durch Vergleich mit einem Standardmarker bekannter Länge (Gene scanTM 500 LIZ[®] Size Standard, Applied Biosystems, Darmstadt) bestimmt. Dazu wurden zunächst 2µl des oben hergestellten PCR-Produkts mit 0,5µl des Standardmarkers und 18,5µl Formamid (Applied Biosystems, Darmstadt) vermischt. Formamid stabilisiert doppelstrangige DNS im elektischen Feld. Mit Hilfe des ABI Prism 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Darmstadt) wird eine Kappilarelektrophorese durchgeführt und anhand der Wanderung der DNS-Stränge im elektrischen Feld die Fragmentlänge bestimmt.

Die hierbei bestimmte Fragmentlänge entspricht der Länge des gesamten Intron 1. Um die Länge der CA-Wiederholungen in diesem Intron zu bestimmen, wurden jeweils zwei homozygote Proben mit gleicher Fragmentlänge für eine Sequenzierung ausgesucht. Die DNS dieser Proben wurde nicht mit Hilfe der PCR, sondern durch Klonierung vermehrt.

Dadurch sollten Verunreinigungen durch die Primersequenzen oder Fremd-DNS vermieden werden.

Das PCR-Produkt dieser homozygoter Proben wurde unter Verwendung des pGEM-T Vector Systems (Promega, Mannheim) mit Hilfe eines Restriktionsenzym in ein Plasmid eingebaut und durch *E. coli*-Bakterien vom Typ DH5 α LE (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt) vermehrt. Im Anschluss wurde die klonierte DNS mit Hilfe des Plasmid Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) aus den Bakterien isoliert und das gesamte Plasmid nach Anleitung des Herstellers mit Hilfe des ABI Prism 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Darmstadt) sequenziert. Dabei kommt die Kettenabbruchmethode nach Sanger zur Anwendung. Die CA-Repeat-Länge konnte nun ausgezählt und der vorher bestimmten Fragmentlänge zugeordnet werden.

Die Länge der CA-Wiederholungen im Intron 1 wurden mit dem Ansprechen und Überleben der Patienten verglichen. Die Summe aus beiden Allel-Längen diene als kontinuierliche Variable für eine ROC-Analyse im Hinblick auf das Ansprechen.

3.6 PTEN-Expression in der Immunhistochemie

Zur Beurteilung der Expression des Proteins PTEN im untersuchten Tumorgewebe wurden die Präparate nach dem Standardprotokoll des immunhistochemischen Labors des Pathologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München immunhistochemisch gefärbt. Die Spezifität des Antikörpers für das humane PTEN wurde an zahlreichen Vorversuchen im Rahmen anderer Projekte des Pathologischen Instituts überprüft und bestätigt. Aus diesem Grund konnte im folgenden Versuch auf eine Negativkontrolle verzichtet werden.

Zur Demaskierung der interessierenden Antigene wurden die Präparate in einer Pufferlösung (Target Retrieval Solution, Dako, Hamburg) mit einem sehr hohen pH von 9,9 für zweimal 15 Minuten einer Mikrowellenbehandlung bei 750 Watt unterzogen. Um bei dieser sehr aggressiven Behandlung ein besseres Haften des Gewebes auf den Objektgläsern zu gewährleisten, wurden zusätzlich neue Schnitte mit einer Dicke von 3-4 μ m auf

silanisierten Objektträgern (LABOnord, Mönchengladbach) angefertigt. Der gegen humanes PTEN gerichtete monoklonale Maus-Antikörper (Primärantikörper, Isotyp IgG2a kappa, Klon 6H2.1, Dako, Hamburg) wurde in einer 1:40-Verdünnung appliziert. Für eine Verstärkung des Farbsignals kam ein gegen Maus-IgG gerichteter Sekundärantikörper zum Einsatz (Anti-Mouse-IgG Pferd-IgG-Antikörper, Vector Laboratories, Burlingame). Dieser ist mit einem Peroxidase-Mikropolymer gekoppelt, an das später das farbgebende Molekül bindet. Um die Hintergrundfärbung zu minimieren, wurde vor Applikation des Primärantikörpers die endogene Peroxidase der Präparate durch Spülen der Schnitte in einer 7,5%igen Wasserstoffperoxid-Lösung geblockt. Die Farbreaktion geschah durch Koppelung von AEC (3-Amino-9-Ethylcarbozol, Dako, Hamburg) an die Peroxidase des Sekundärantikörpers. Hierfür wurden die Präparate für 10 Minuten bei Raumtemperatur in der AEC-Lösung inkubiert. Die Antikörper-markierten PTEN-Proteine erhielten dadurch eine rote Farbgebung. Die Gegenfärbung des Gewebes wurde mit Hämatoxylin (Hematoxylin Gill's Formula, Vector Laboratories, Burlingame) durchgeführt, wodurch die Zellen eine blaue Farbe erhielten. Zwischen den einzelnen Schritten der immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate wiederholt in einem Puffer mit pH 7,5 (Tris-Puffer) gespült.

Die Auswertung wurde lichtmikroskopisch bei 10- bis 40-facher Vergrößerung analog zu Loupakis et al. durchgeführt [27]. Im Tumorareal liegende Endothelzellen wurden als endogene Positivkontrolle verwendet. Je nach Intensität und Anteil des gefärbten Areal wurden Punkte vergeben, deren Summe den Bewertungsscore ergab (siehe Tabelle 3.1). Präparate mit einem Score von 0 bis 3 Punkten wurden als PTEN-negativ eingestuft und wiesen damit einen PTEN-loss auf. Die Beurteilung der Präparate wurde von zwei unabhängigen Prüfern durchgeführt. Das Auftreten des PTEN-loss wurde mit dem Ansprechen und Überleben der Patienten verglichen.

Intensität der Färbung	Punkte	Anteil am Tumoreal	Punkte	Summe	PTEN-Status
keine	0	0	0	0-3	negativ
schwach	1	$\leq 20\%$	1		
mittel	2	20-50%	2	≥ 4	positiv
stark	3	$> 50\%$	3		

Tab. 3.1: Kriterien für die Score-Ermittlung zur Beurteilung des PTEN-Status
(nach Loupakis et al.): Präparate mit einem Score ≤ 3 weisen einen PTEN-loss auf

3.7 Statistische Analysen

Die Dokumentation und statistische Auswertung erfolgte unter Anwendung der Software SPSS PAWS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Partielle (PR) oder komplette Remission (CR) wurde als Ansprechen beurteilt (overall response rate $ORR=PR+CR$). Für die Berechnung des p-Wertes für den Zusammenhang von Ansprechraten und Genexpression bzw. Genkopiezahl wurde der zweiseitige Fisher's Exact Test verwendet. Die Auswertung des progressionsfreien Überlebens (PFS) und der Gesamtüberlebenszeit (OS) erfolgte deskriptiv anhand von Kaplan-Meier Überlebenskurven. Unterschiede im Überleben wurde mit dem Log-Rank Test dargestellt. Ein Alpha von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Es wurden ROC-Analysen (receiver operating characteristic) in Hinblick auf das Ansprechen durchgeführt. Als Cut-off wurden jeweils Werte ausgewählt, bei denen die Summe aus Sensitivität und Spezifität maximal war.

4 Ergebnisse

Die Durchführung aller molekulargenetischer Untersuchungen sowie deren Auswertung und statistische Analysen wurden ohne Kenntnis der klinischen Parameter der Patienten verblindet absolviert.

4.1 Ansprechen und Überleben in der Gesamtpopulation

Von September 2004 bis Dezember 2006 wurden 185 Patienten rekrutiert und in zwei Behandlungsarme randomisiert. Die ITT-Population (intention to treat-Population) umfasste 177 Patienten. Acht Patienten verstarben bzw. zogen die Einverständniserklärung zurück. 28 Patienten haben die Behandlung vor Durchführung des ersten Staging abgebrochen, sodass zur Effektivitätsbeurteilung 149 Patienten zur Verfügung standen. Die häufigste Ursache für vorzeitiges Ausscheiden war eine allergische Reaktion auf die Cetuximab-Infusion.

Die Ansprechrates wurde als Summe aus kompletter und partieller Remission (overall response rate, ORR) definiert und lag im CAPIRI/CET-Arm (Arm A) bei 46,1% (95% CI: 35,4-57,0%) und im CAPOX/CET-Arm (Arm B) bei 47,7% (95% CI: 37,0-58,7%). Die Krankheitsstabilisierungsrate (disease control rate, DCR = CR+PR+SD) lag in Arm A bei 84,6% (95% CI: 74,7-91,8%) und in Arm B bei 95,8% (95% CI: 88,1-99,8%). Der KRAS-Status konnte bei 144 Patienten erhoben werden. Bei 38,2% der Patienten lagen

Mutationen vor. Der KRAS-Status hatte keinen Einfluss auf das Ansprechen (ORR Wildtyp vs. Mutation: Arm A 50,0% vs. 48,5% und Arm B 44,9% vs 50,0%) [30].

Eine Übersicht über die Charakteristika der Studienpopulation und der untersuchten Population zeigt Tabelle 4.1.

CIOX-Population (n=177)	Merkmal	Untersuchte Population (n=149)
63 Jahre (32-77 Jahre)	Alter	63 Jahre (33-76 Jahre)
36,2% (64)	Alter > 65 Jahre	40,2% (60)
Weiblich 28,8% (51)	Geschlecht	Weiblich 28,9% (43)
Männlich 71,2% (126)		Männlich 71,1% (106)
Wildtyp 50,3% (89)	KRAS-Status	Wildtyp 60,4% (90)
Mutation 31,1% (55)		Mutation 34,2% (51)
unbekannt 18,6% (33)		unbekannt 5,4% (8)
Kolon 63,8% (113)	Tumor-Lokalisation	Kolon 65,1% (97)
Rektum 34,5% (61)		Rektum 33,6% (50)
Kolon&Rektum 1,7% (3)		Kolon&Rektum 1,3% (2)

Tab. 4.1: Patientencharakteristika der Gesamtpopulation und der untersuchten Population

4.2 Amphiregulin- und Epiregulin-Expression und Ansprechen

Bei 118 Patienten (80,8%) wurde die EGFR-Liganden-Expression erfolgreich gemessen. Bei 28 Patienten konnte aufgrund einer unzureichenden Fixierung nicht genügend RNS extrahiert werden.

Amphiregulin

In der Real-Time PCR wurde die Anzahl der Kopien an cDNA von AREG gemessen. Diese

Kopienzahlen wurden mit den Referenzgenen GAPDH und β -Actin ins Verhältnis gesetzt. Es ergaben sich Werte zwischen 0,05 und 1500. Mit Hilfe einer ROC-Analyse konnte ein Verhältnis von 8,855 als der Cut-off identifiziert werden, der am besten therapieempfindlichere Patienten von therapieresistenteren trennt (Sensitivität 56,9%, Spezifität 75,6%). Patienten mit einem größeren Verhältnis von AREG zu den Referenzgenen zeigen ein besseres Ansprechen (ORR 44,6% vs. 76,7%, $p=0,002$). Im PFS (5,4 Monate vs. 9,6 Monate, $p<0,001$) und OS (17,2 Monate vs. 37,4 Monate, $p<0,001$) zeigen Patienten mit höheren AREG-Werten ein hochsignifikant längeres Überleben.

AREG	<8,855 (n=56)	$\geq 8,855$ (n=43)	p
PD	13%	2%	0,133
SD	43%	21%	0,031
PR	43%	67%	0,025
CR	2%	9%	0,163
ORR	45%	77%	0,002
DCR	88%	98%	0,133

Tab. 4.2: Ansprechen in Abhängigkeit von der AREG-Expression

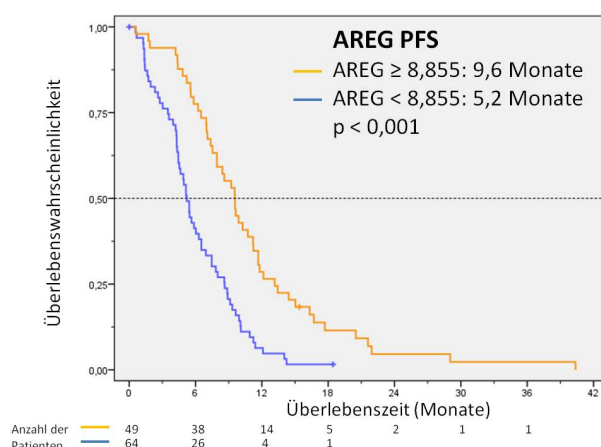


Abb. 4.1: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation

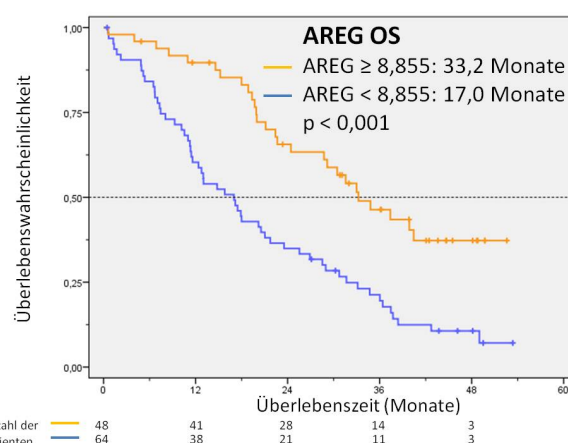


Abb. 4.2: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation

Betrachtet man die Population getrennt nach Behandlungsarmen, so trennt der definierte Cut-off auch hier signifikant. In beiden Armen zeigen die Patienten mit höheren AREG-Werten ein besseres Ansprechen und längeres Überleben bei Therapie mit Cetuximab (siehe Tab. 4.3 und 4.4 sowie Abb. 4.3, 4.4, 4.5 und 4.6).

AREG CAPIRI	<8,855 (n=30)	≥8,855 (n=22)	p
PD	20%	5%	0,216
SD	40%	23%	0,240
PR	40%	68%	0,055
CR	0%	5%	0,423
ORR	40%	73%	0,026
DCR	80%	96%	0,216

Tab. 4.3: Arm A: Ansprechen in Abhängigkeit von der AREG-Expression

AREG CAPOX	<1,055 (n=26)	≥1,055 (n=21)	p
PD	4%	0%	>0,99
SD	46%	19%	0,068
PR	46%	67%	0,239
CR	4%	14%	0,311
ORR	50%	81%	0,036
DCR	96%	100%	>0,99

Tab. 4.4: Arm B: Ansprechen in Abhängigkeit von der AREG-Expression

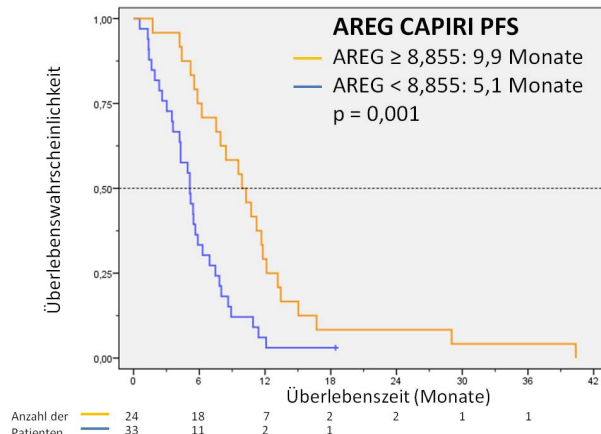


Abb. 4.3: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A

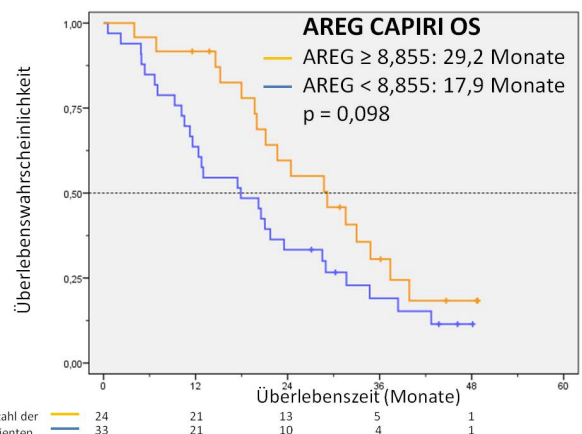


Abb. 4.4: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A

Die Auswertung der AREG-Daten wurde auch unter Berücksichtigung des KRAS-Status der Patienten durchgeführt. In der Gruppe der KRAS-Wildtyp-Patienten (KRAS-WT) zeigt sich ein signifikant besseres Ansprechen der Patienten mit hohen AREG-Werten (siehe Tab. 4.5). Beim PFS und OS besteht sogar ein hochsignifikanter Unterschied der beiden Gruppen (siehe Abb. 4.8 und 4.7).

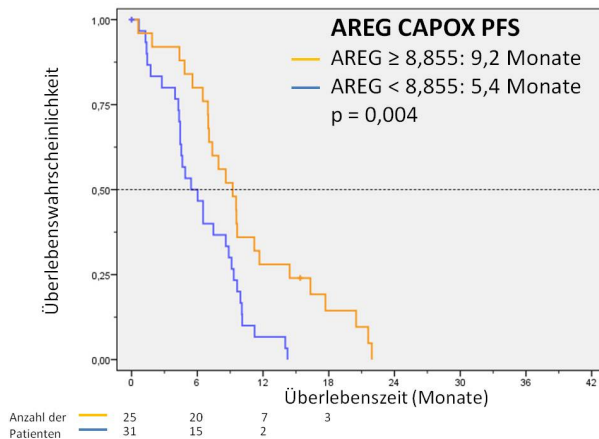


Abb. 4.5: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B

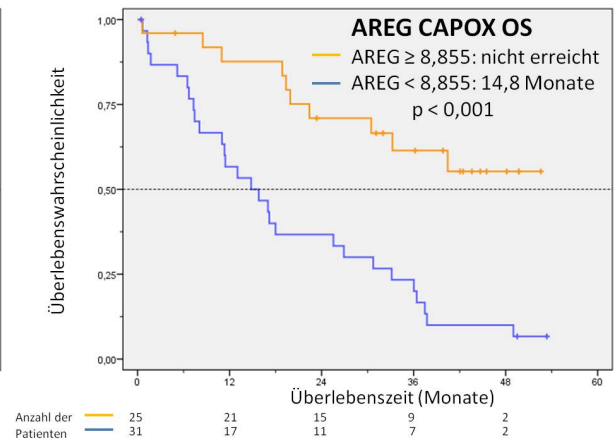


Abb. 4.6: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B

In der Gruppe der KRAS-mutierten Patienten (KRAS-MUT) konnte das Signifikanzniveau aufgrund der kleinen Fallzahl (AREG < Cut-off n=21, AREG ≥ Cut-off n=19) nicht erreicht werden. Dennoch zeigt sich sowohl im Ansprechen (ORR AREG < Cut-off vs. AREG ≥ Cut-off 43% vs. 68%, p=0,125) als auch im Überleben eine deutliche Tendenz zum besseren Ansprechen und längeren Überleben der Patienten mit hohen AREG-Werten (PFS AREG < Cut-off vs. AREG ≥ Cut-off 5,6 Monate vs. 9,2 Monate, p=0,104; OS AREG < Cut-off vs. AREG ≥ Cut-off 14,8 Monate vs. 28,7 Monate, p=0,471).

AREG KRAS- WT	<8,855 (n=35)	≥8,855 (n=24)	p
PD	17%	0%	0,072
SD	37%	17%	0,143
PR	46%	67%	0,183
CR	0%	17%	0,023
ORR	46%	83%	0,006
DCR	83%	100%	0,072

Tab. 4.5: KRAS-WT: Ansprechen in Abhängigkeit von der AREG-Expression

AREG KRAS- MUT	<8,855 (n=21)	≥8,855 (n=19)	p
PD	5%	5%	>0,99
SD	52%	26%	0,117
PR	38%	68%	0,067
CR	5%	0%	>0,99
ORR	43%	68%	0,125
DCR	95%	95%	>0,99

Tab. 4.6: KRAS-MUT: Ansprechen in Abhängigkeit von der AREG-Expression

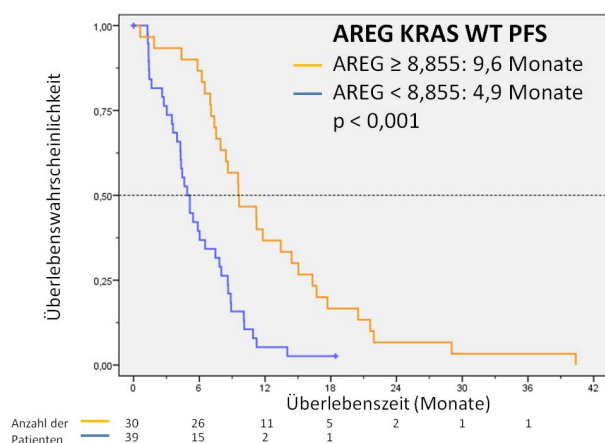


Abb. 4.7: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population

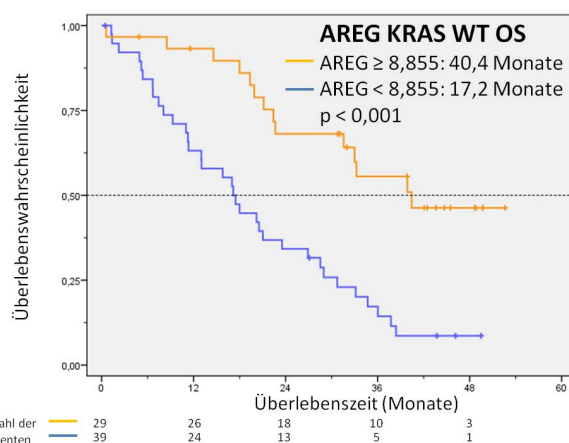


Abb. 4.8: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population

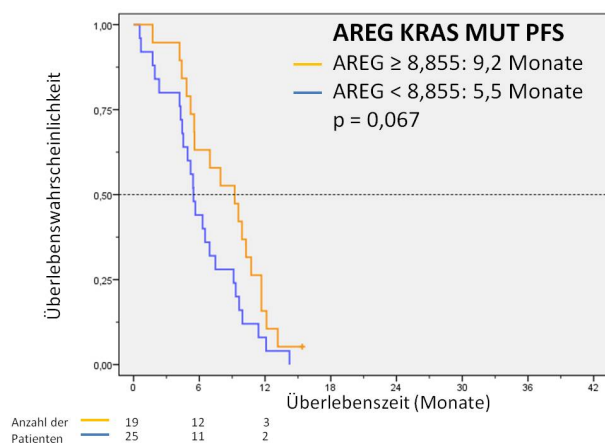


Abb. 4.9: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population

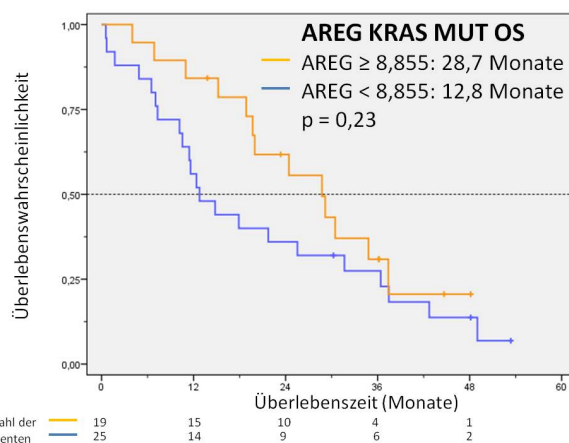


Abb. 4.10: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population

Epiregulin

In der Real-Time PCR wurde die Anzahl der Kopien an cDNA von Epiregulin gemessen. Diese Kopienzahlen wurden mit den Referenzgenen ins Verhältnis gesetzt. Es ergaben sich Werte zwischen 0,7 und 16000. Mit Hilfe einer ROC-Analyse konnte ein Verhältnis von 31,655 als der Cut-off identifiziert werden, der am besten therapieempfindlichere Patienten von therapieresistenteren trennt (Sensitivität 50,9%, Spezifität 73,3%). Patienten mit einem höheren EREG-Wert als der Cut-off zeigen ein hochsignifikant besseres Ansprechen auf die Therapie (ORR 42,3% vs. 76,6%, $p=0,001$). Auch im Überleben liegt ein Unter-

schied zwischen beiden Gruppen vor (siehe Abb. 4.11 und 4.12).

EREG	<31,655 (n=52)	≥31,655 (n=47)	p
PD	12%	4%	0,274
SD	46%	19%	0,006
PR	42%	66%	0,026
CR	0%	11%	0,021
ORR	42%	77%	0,001
DCR	89%	96%	0,274

Tab. 4.7: Ansprechen in Abhängigkeit von der EREG-Expression

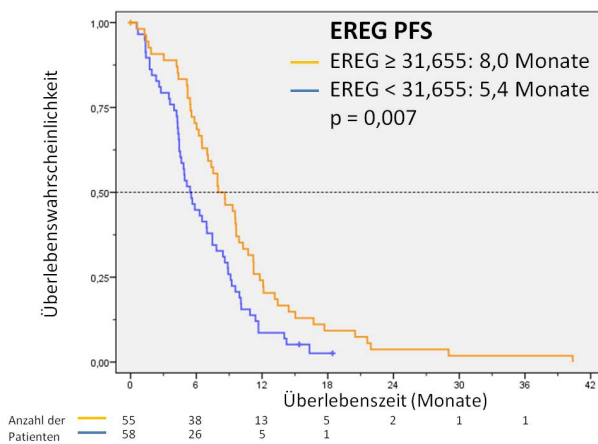


Abb. 4.11: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation

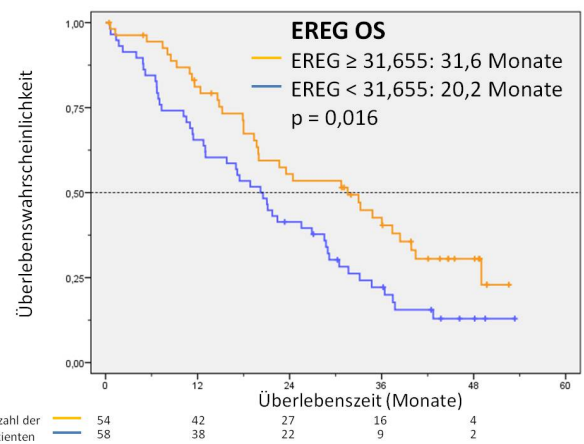


Abb. 4.12: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation

Getrennt nach Behandlungsgruppen bleibt die statistische Signifikanz im Ansprechen erhalten. Patienten mit höheren EREG-Werten als der Cut-off zeigen in beiden Armen ein besseres Ansprechen. Bezogen auf das progressionsfreie Überleben konnte das Signifikanzniveau nur in Arm A erreicht werden.

EREG CAPIRI	<31,655 (n=26)	≥31,655 (n=26)	p
PD	23%	4%	0,099
SD	50%	23%	0,237
PR	35%	69%	0,025
CR	0%	4%	>0,99
ORR	35%	73%	0,012
DCR	77%	96%	0,099

Tab. 4.8: Arm A: Ansprechen in Abhängigkeit von der EREG-Expression

EREG CAPOX	<31,655 (n=26)	≥31,655 (n=21)	p
PD	0%	5%	0,447
SD	50%	14%	0,014
PR	50%	62%	0,557
CR	0%	19%	0,034
ORR	50%	81%	0,036
DCR	100%	95%	0,447

Tab. 4.9: Arm B: Ansprechen in Abhängigkeit von der EREG-Expression

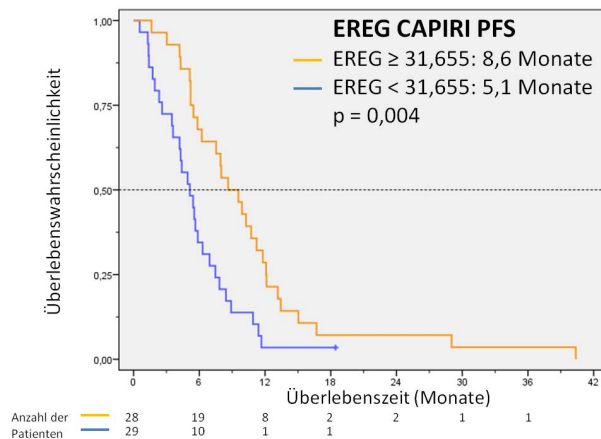


Abb. 4.13: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A

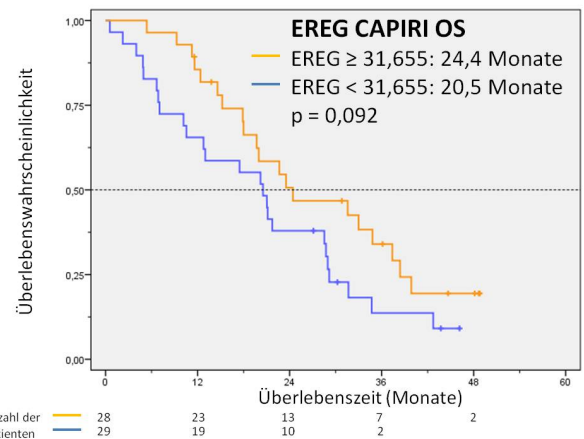


Abb. 4.14: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A

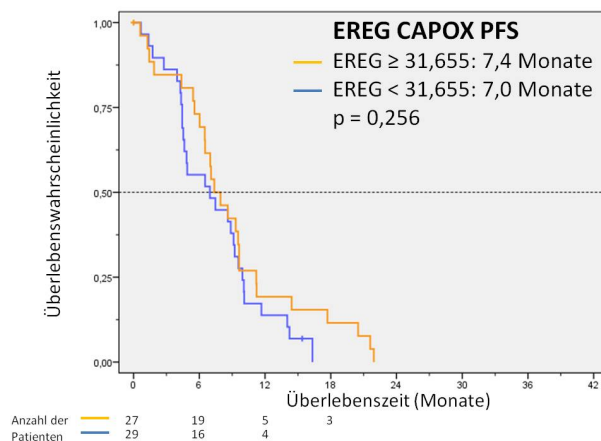


Abb. 4.15: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B

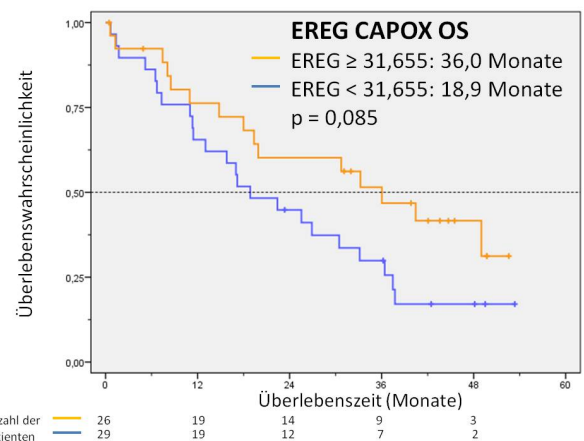


Abb. 4.16: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B

Die Auswertung der EREG-Daten wurde auch unter Berücksichtigung des KRAS-Status der Patienten durchgeführt. In der Gruppe der KRAS-WT-Patienten zeigt sich ein signifikant besseres Ansprechen und längeres Überleben der Patienten mit hohen EREG-Werten (siehe Tab. 4.10 sowie Abb. 4.17 und 4.18).

EREG KRAS- WT	<31,655 (n=28)	≥31,655 (n=31)	p
PD	14%	6%	0,409
SD	39%	19%	0,149
PR	46%	61%	0,302
CR	0%	13%	0,114
ORR	46%	74%	0,036
DCR	86%	94%	0,409

Tab. 4.10: KRAS-WT: Ansprechen in Abhängigkeit von der AREG-Expression

EREG KRAS- MUT	<31,655 (n=24)	≥31,655 (n=16)	p
PD	8%	0%	0,508
SD	54%	19%	0,047
PR	38%	75%	0,027
CR	0%	6%	0,4
ORR	38%	81%	0,01
DCR	92%	100%	0,508

Tab. 4.11: KRAS-MUT: Ansprechen in Abhängigkeit von der AREG-Expression

In der Gruppe der KRAS-mutierten Patienten (KRAS-MUT) wurde trotz der kleinen Fallzahl (EREG <Cut-off n=24, EREG ≥Cut-off n=16) das Signifikanzniveau beim Ansprechen erreicht (ORR EREG <Cut-off vs. EREG ≥Cut-off 38% vs. 81%, p=0,01). Beim progressionsfreien Überleben zeigt sich eine deutliche Tendenz zu längeren Überlebenszeiten bei Patienten mit hohen EREG-Werten (PFS EREG <Cut-off vs. EREG ≥Cut-off 5,6 Monate vs. 9,3 Monate, p=0,425, siehe Tab. 4.11 sowie Abb. 4.19 und 4.20).

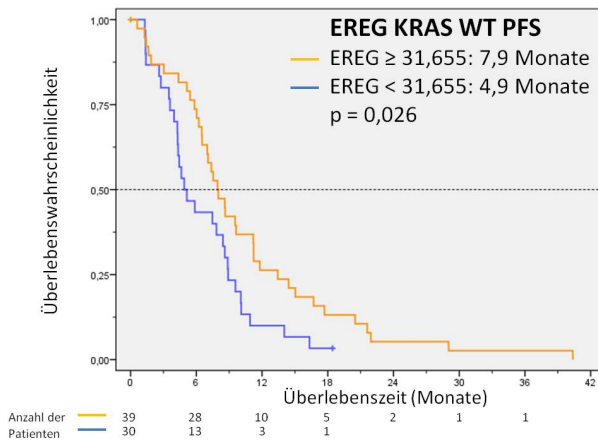


Abb. 4.17: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population

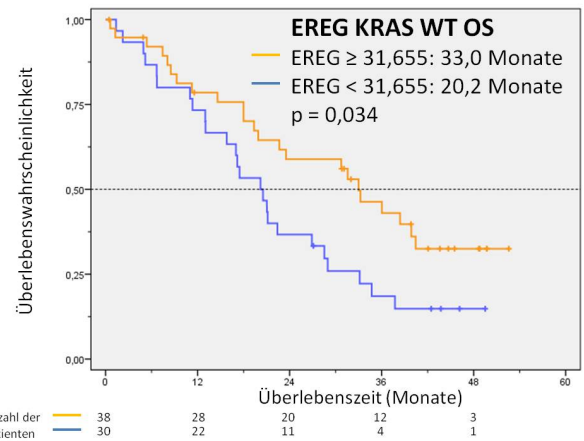


Abb. 4.18: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population

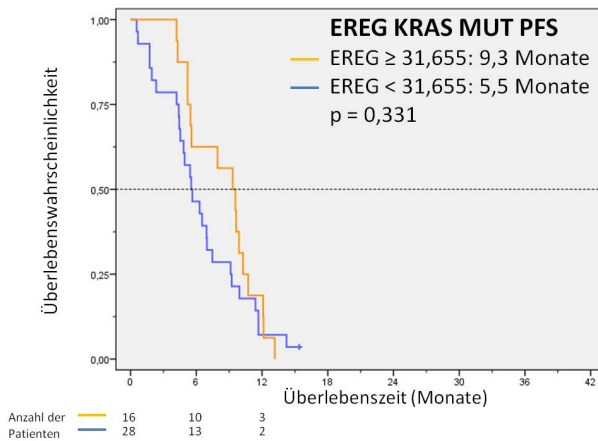


Abb. 4.19: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population

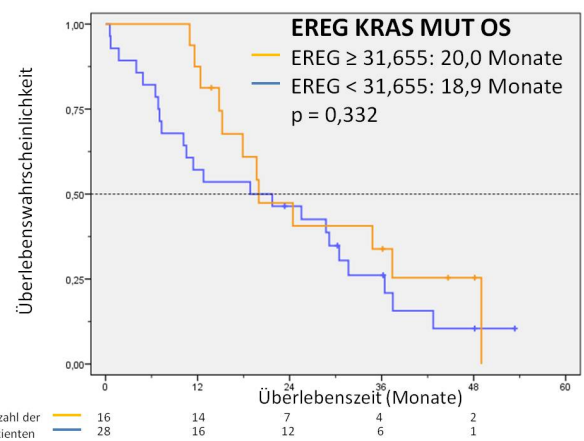


Abb. 4.20: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population

4.3 EGFR-Genkopiezahl und Ansprechen

Die Zahl der Genkopien des EGFR-Gens pro Tumorzellkern wurde mit Hilfe der FISH-Analyse bestimmt. Die Hybridisierung wurde an 146 Präparaten durchgeführt. Davon konnten 120 (82%) ausgewertet werden. Bei 26 Präparaten war keine Beurteilung möglich, hauptsächlich aufgrund eines fehlenden Fluoreszenzsignals oder weil das Tumorge-webe während der Prozedur denaturierte.

Das untersuchte Gewebe zeigte nur stellenweise eusome Areale mit zwei Zentromer-Signalen (rot) und zwei EGFR-Gen-Signalen (grün) (siehe Abb. 4.21). Alle Proben zeigten eine Vermehrung des EGFR-Gens (Polysomie) in unterschiedlichem Ausmaß. Für eine grobe Übersicht wurden die Präparate nach Cappuzzo et al. [8] in drei Gruppen aufgeteilt:

- “schwache Polysomie“ ($<10\%$ der Zellkerne mit ≥ 4 Gensignalen; siehe Abb. 4.22)
- “mittlere Polysomie“ (10-40% der Zellkerne mit ≥ 4 Gensignalen; siehe Abb. 4.23)
- “starke Polysomie“ ($\geq 40\%$ der Zellkerne mit ≥ 4 Gensignalen; siehe Abb. 4.24)

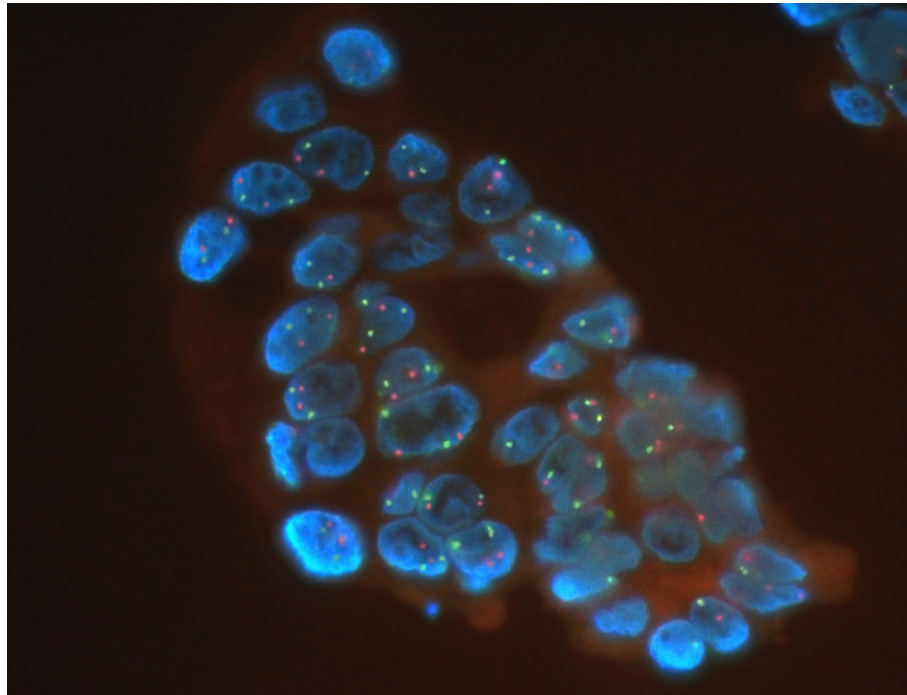


Abb. 4.21: EGFR FISH: Beispiel für eine eusomes Areal im DAPI-Filter:
Die meisten Zellkerne weisen zwei EGFR-Signale (grün) und zwei Zentromer-Signale (rot) auf

59 Proben (49%) weisen eine starke Polysomie, 49 (41%) eine mittlere Polysomie und 12 (10%) eine schwache Polysomie auf. Für den Vergleich mit dem Ansprechen der Patienten wurde beschlossen, die Genkopiezahl zu bestimmen, da zu diesem Parameter die meisten Daten in der Literatur vorliegen.

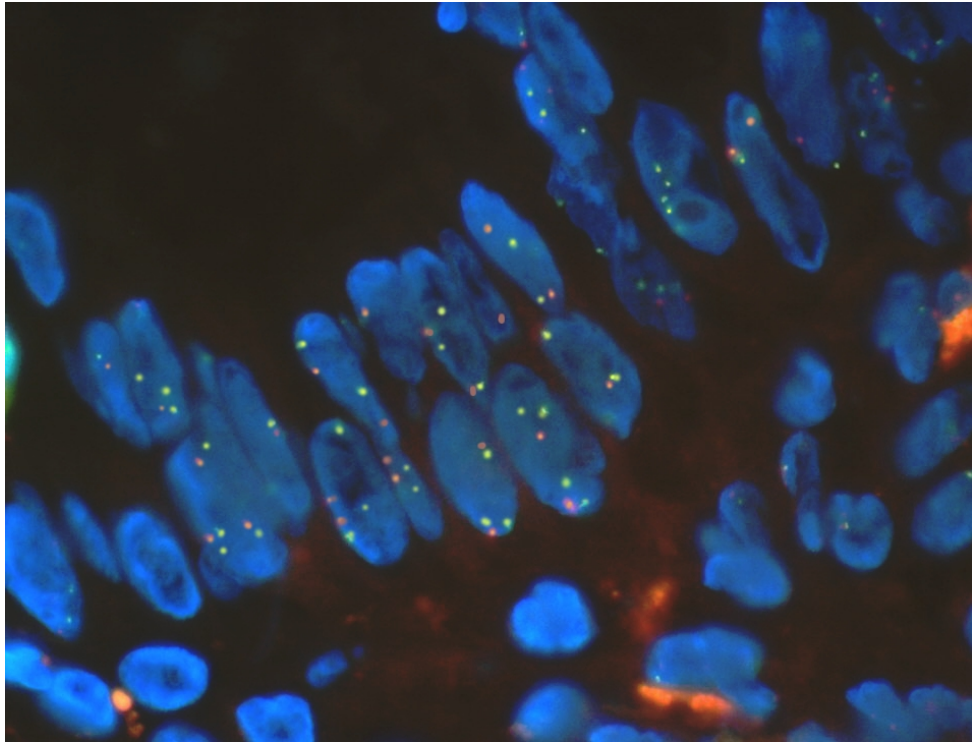


Abb. 4.22: EGFR FISH: Präparat mit schwacher Polysomie im DAPI-Filter:
<10% der Zellkerne haben ≥ 4 Gensignale (grün; Zentromer-Signal rot)

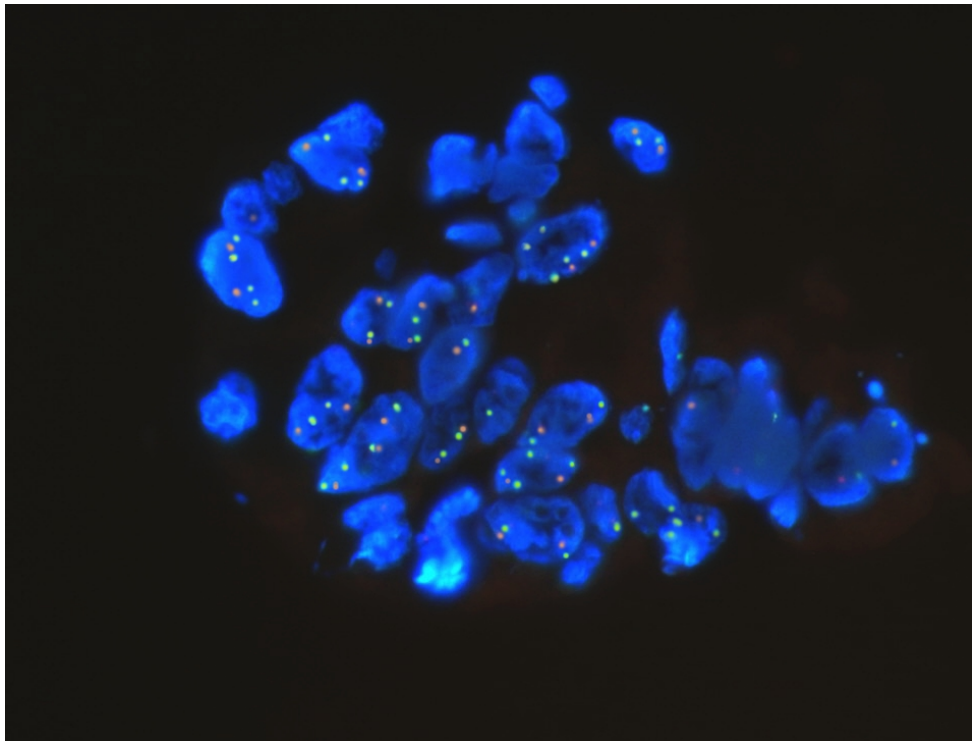


Abb. 4.23: EGFR FISH: Präparat mit mittlerer Polysomie im DAPI-Filter:
10-40% der Zellkerne haben ≥ 4 Gensignale (grün; Zentromer-Signal rot)

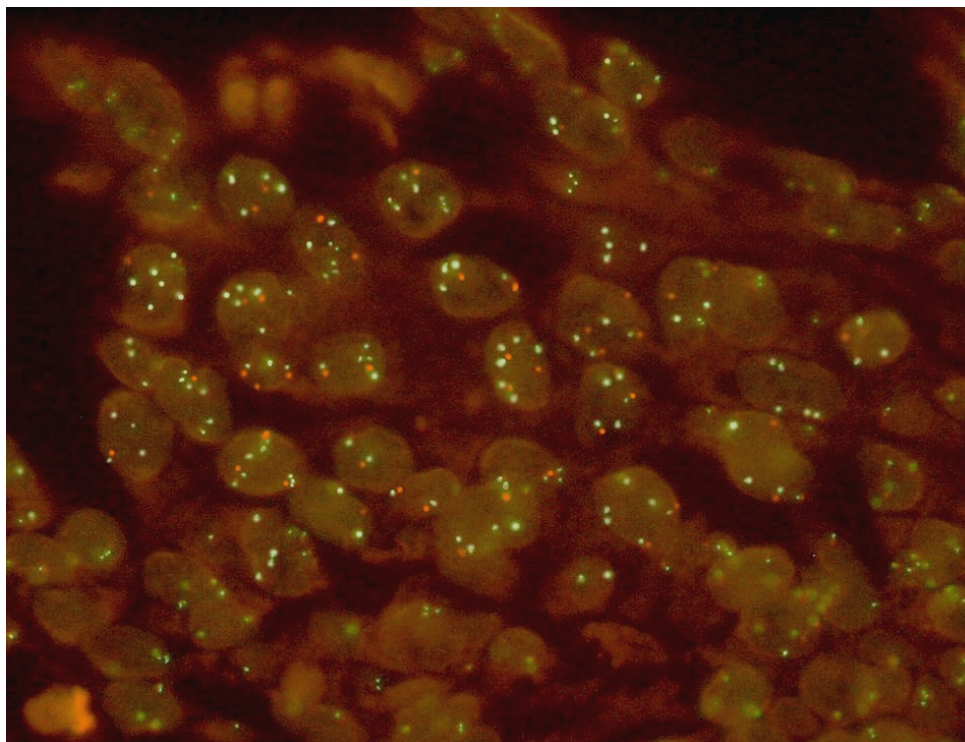


Abb. 4.24: EGFR FISH: Präparat mit starker Polysomie im Dualbandfilter:
≥40% der Zellkerne haben ≥4 Gensignale (grün; Zentromer-Signal rot)

EGFR-Genkopiezahl

Bei allen Präparaten wurde eine durchschnittliche EGFR-Signalzahl pro Zellkern bestimmt. Diese entspricht der Genkopiezahl (gene copy number, GCN), das heißt der durchschnittlichen EGFR-Gen-Anzahl pro Zellkern. Mit Hilfe einer ROC-Analyse wurden 3,82 EGFR-Signale pro Zellkern als der am besten trennende Cut-off bestimmt (Sensitivität 61,1%, Spezifität 73,3%). Patienten mit durchschnittlich mehr EGFR-Signalen pro Zellkern, also einer höheren EGFR-GCN zeigen ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie ($p=0,022$) in der Gesamtpopulation.

EGFR-GCN	GCN<3,82 (n=59)	GCN≥3,82 (n=39)	p
PD	10%	8%	>0,99
SD	46%	23%	0,032
PR	39%	62%	0,039
CR	5%	8%	0,680
ORR	44%	69%	0,022
DCR	90%	92%	>0,99

Tab. 4.12: Ansprechen in Abhängigkeit von der EGFR-GCN

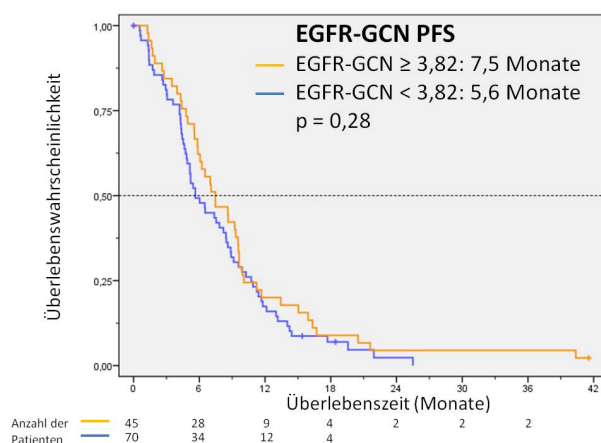


Abb. 4.25: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation

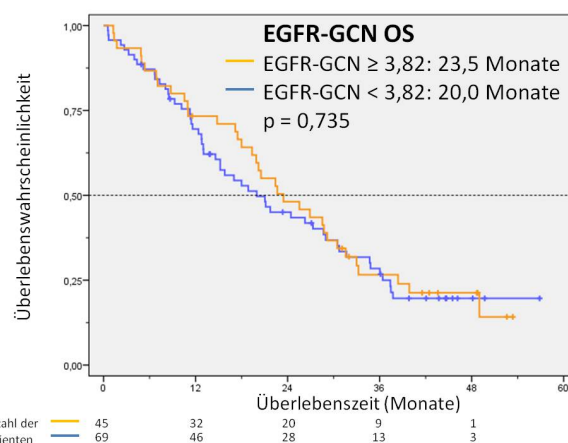


Abb. 4.26: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation

Getrennt nach Behandlungsarmen liegt beim CAPIRI/CET-Arm (Arm A) kein Unterschied im Ansprechen vor, während im CAPOX/CET-Arm (Arm B) das Ansprechen der Patienten mit höherer EGFR-GCN besser ist (ORR 38,5% vs. 79%, $p=0,014$). Beim PFS und OS ergab sich weder in der Gesamtpopulation noch in der nach Armen getrennten Untersuchung ein Unterschied zwischen beiden Gruppen.

EGFR CAPIRI	<3,82 (n=33)	≥3,82 (n=20)	p
PD	12%	15%	>0,99
SD	39%	25%	0,375
PR	46%	55%	0,577
CR	3%	5%	>0,99
ORR	49%	60%	0,571
DCR	88%	85%	>0,99

Tab. 4.13: Arm A: Ansprechen in Abhängigkeit von der EGFR-GCN

EGFR CAPOX	<3,82 (n=26)	≥3,82 (n=19)	p
PD	8%	0%	0,501
SD	54%	21%	0,035
PR	31%	68%	0,017
CR	8%	11%	>0,99
ORR	39%	79%	0,014
DCR	92%	100%	0,501

Tab. 4.14: Arm B: Ansprechen in Abhängigkeit von der EGFR-GCN

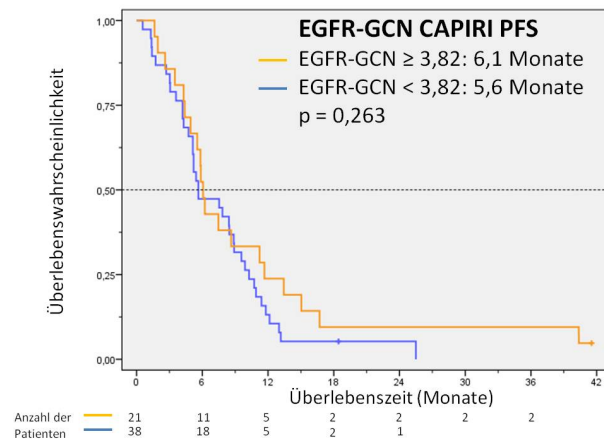


Abb. 4.27: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A

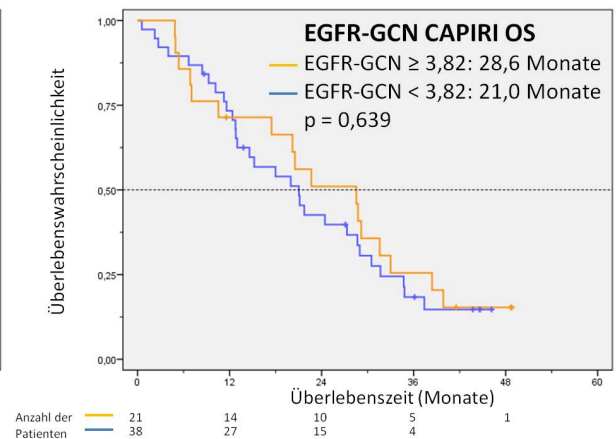


Abb. 4.28: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A

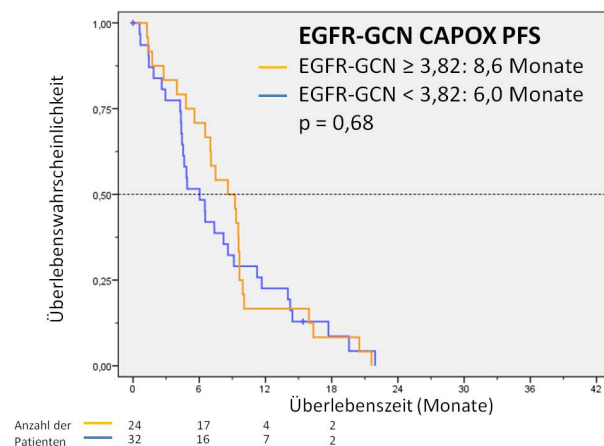


Abb. 4.29: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B

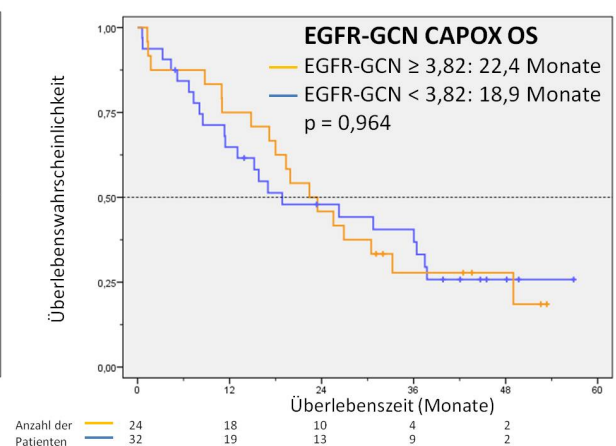


Abb. 4.30: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B

Das Ansprechen und Überleben wurde auch in Abhängigkeit vom KRAS-Status beurteilt. Patienten der KRAS-Wildtypgruppe zeigten ein signifikant besseres Ansprechen bei einer hohen EGFR-GCN (ORR EGFR <Cut-off vs. EGFR \geq Cut-off 40% vs. 74%, $p=0,01$). Im PFS und OS konnte das Signifikanzniveau in dieser Gruppe nicht erreicht werden (siehe Abb. 4.31 und 4.32).

EGFR GCN KRAS-WT	<3,82 (n=35)	$\geq 3,82$ (n=27)	p
PD	14%	7%	0,455
SD	46%	19%	0,032
PR	34%	67%	0,020
CR	6%	7%	>0,99
ORR	40%	74%	0,010
DCR	86%	93%	0,455

Tab. 4.15: KRAS-WT: Ansprechen in Abhängigkeit von der EGFR-GCN

EGFR GCN KRAS-MUT	<3,82 (n=24)	$\geq 3,82$ (n=12)	p
PD	4%	8%	>0,99
SD	46%	33%	0,721
PR	46%	50%	>0,99
CR	4%	8%	>0,99
ORR	50%	58%	0,732
DCR	96%	92%	>0,99

Tab. 4.16: KRAS-MUT: Ansprechen in Abhängigkeit von der EGFR-GCN

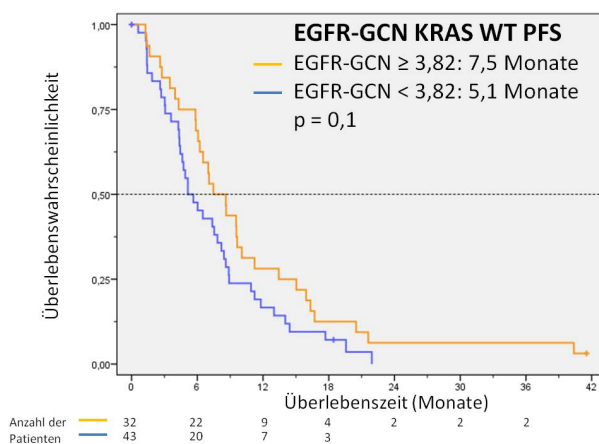


Abb. 4.31: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population

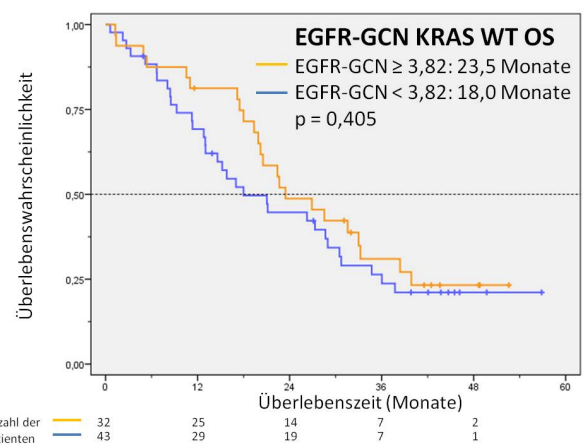


Abb. 4.32: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population

Im Gegensatz dazu bestand in der KRAS-mutierten Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit niedrigen oder hohen EGFR-GCN-Werten (siehe Tab. 4.15 und 4.16 sowie Abb. 4.33 und 4.34).

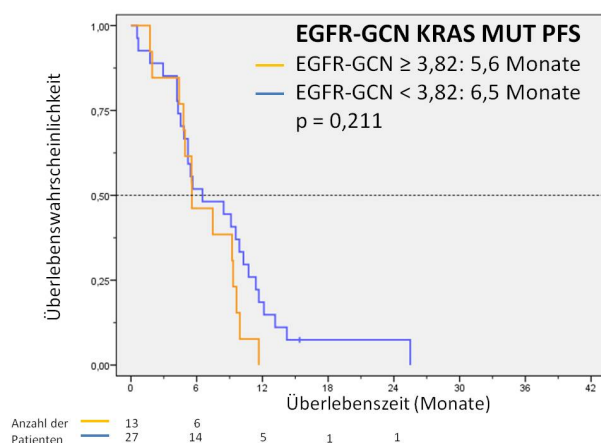


Abb. 4.33: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population

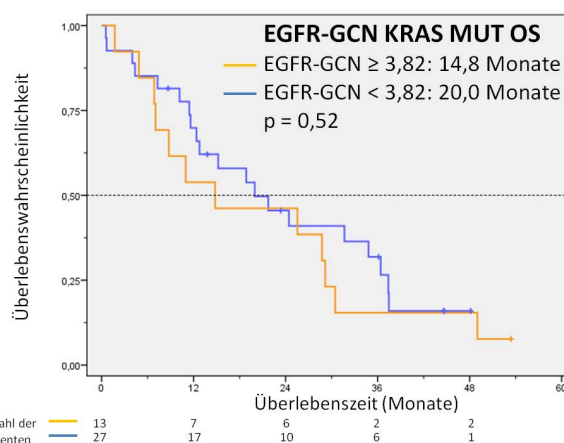


Abb. 4.34: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population

Verhältnis der EGFR-Genkopiezahl zu Chromosom 7

Weil viele Präparate nicht nur eine Vermehrung des EGFR-Gens sondern auch eine erhöhte Anzahl des gesamten Chromosoms 7 ($n > 2$) zeigten, wurde versucht, diesen Faktor durch Berechnung des durchschnittlichen Verhältnisses (EGFR/CEN7) in die Beurteilung einzubeziehen. Mit Hilfe einer ROC-Analyse konnte ein EGFR/CEN7-Verhältnis von 1,055 als der am besten trennende Cut-off bestimmt werden (Sensitivität 67,9%, Spezifität 57,8%). Patienten mit einem größeren EGFR/CEN7-Verhältnis zeigten gegenüber Patienten mit einem niedrigeren Verhältnis ein signifikant besseres Ansprechen in der Gesamtpopulation ($p=0,014$). Auch im PFS (7,1 Monate vs. 10,0 Monate, $p=0,048$) und OS (17,2 Monate vs. 29,2 Monate, $p=0,008$) zeigte sich ein längeres Überleben in der Population mit größerem Verhältnis.

EGFR/CEN7-Verhältnis	<1,055 (n=43)	≥1,055 (n=55)	p
PD	14%	6%	0,175
SD	47%	29%	0,093
PR	37%	56%	0,069
CR	2%	9%	0,226
ORR	40%	66%	0,014
DCR	86%	95%	0,175

Tab. 4.17: Ansprechen in Abhängigkeit vom EGFR/CEN7-Verhältnis

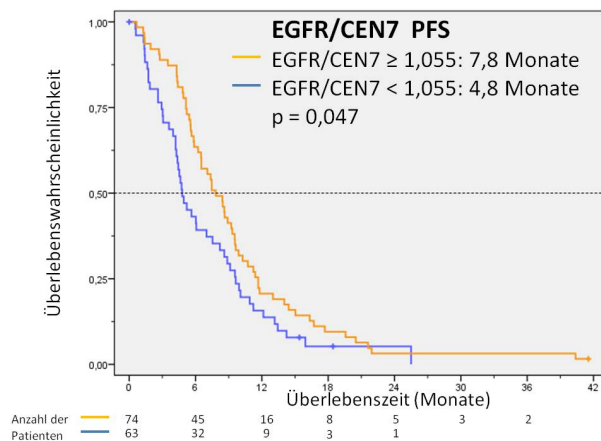


Abb. 4.35: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation

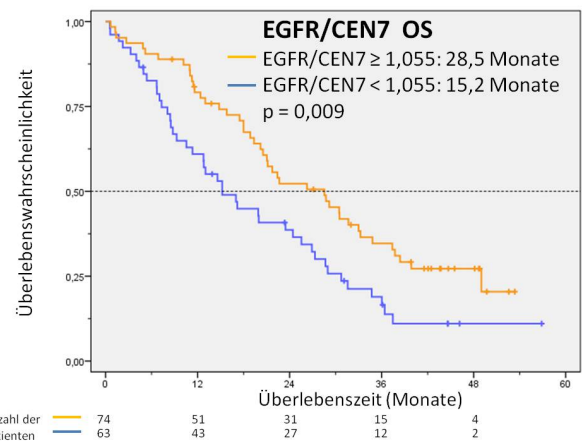


Abb. 4.36: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation

Betrachtet man die Population getrennt nach Behandlungsarmen, so ergibt sich beim CAPIRI/CET-Arm (Arm A) kein signifikanter Unterschied beider Gruppen, während im CAPOX/CET-Arm (Arm B) ein hochsignifikanter Unterschied im Ansprechen und Überleben besteht (ORR 28,6% vs. 79,2%, $p=0,001$, siehe Tab. 4.18 und 4.19).

EGFR/CEN7 CAPIRI	<1,055 (n=22)	≥1,055 (n=31)	p
PD	18%	10%	0,431
SD	32%	35%	>0,99
PR	46%	52%	0,782
CR	5%	3%	>0,99
ORR	50%	55%	0,785
DCR	82%	90%	0,431

Tab. 4.18: Arm A: Ansprechen in Abhängigkeit vom EGFR/CEN7-Verhältnis

EGFR/CEN7 CAPOX	<1,055 (n=21)	≥1,055 (n=24)	p
PD	10%	0%	0,212
SD	62%	21%	0,006
PR	29%	63%	0,036
CR	0%	17%	0,111
ORR	29%	79%	0,001
DCR	91%	100%	0,212

Tab. 4.19: Arm B: Ansprechen in Abhängigkeit vom EGFR/CEN7-Verhältnis

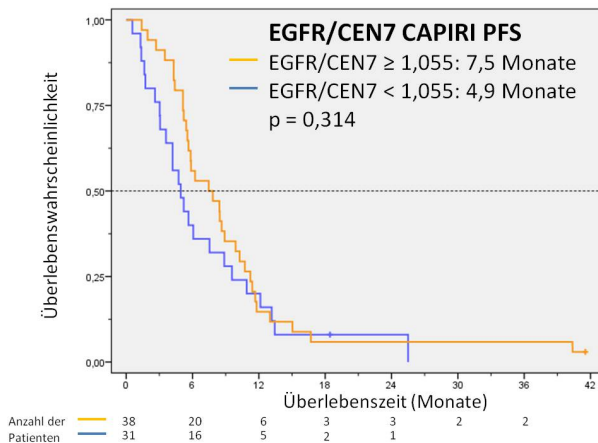


Abb. 4.37: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A

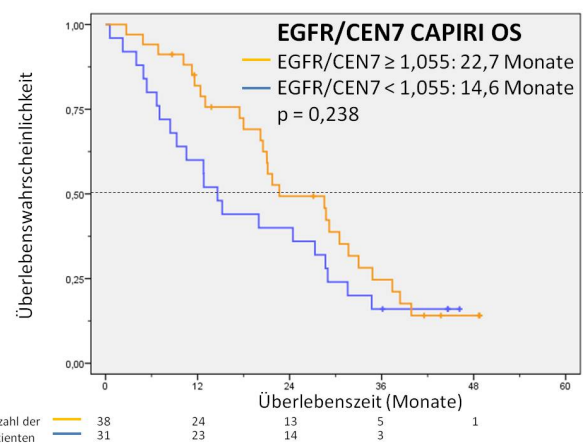


Abb. 4.38: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A

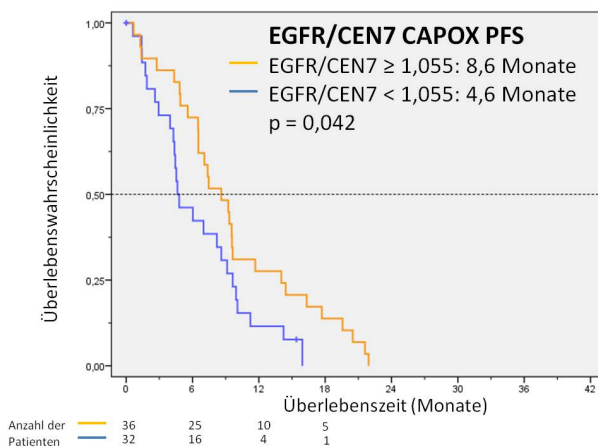


Abb. 4.39: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B

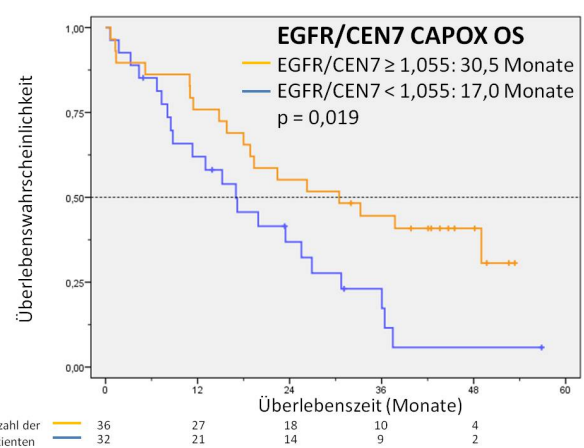


Abb. 4.40: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B

Das Ansprechen und Überleben wurde auch in Abhängigkeit vom KRAS-Status betrachtet. Die Patienten der KRAS-WT-Gruppe zeigen bei hohen EGFR/CEN7-Werten ein signifikant besseres Ansprechen sowie längere Überlebenszeiten (siehe Tab. 4.20 sowie Abb. 4.41 und 4.42). In der Gruppe der KRAS-mutierten Patienten zeigte das EGFR/CEN7-Verhältnis keinen Einfluss auf das Ansprechen und Überleben (siehe Tab. 4.21 sowie Abb. 4.43 und 4.44).

EGFR/CEN7 KRAS-WT	<1,055 (n=27)	≥1,055 (n=35)	p
PD	19%	6%	0,223
SD	48%	23%	0,058
PR	33%	60%	0,044
CR	0%	11%	0,125
ORR	33%	71%	0,004
DCR	81%	94%	0,223

Tab. 4.20: KRAS-WT: Ansprechen in Abhängigkeit vom EGFR/CEN7-Verhältnis

EGFR/CEN7 KRAS-MUT	<1,055 (n=16)	≥1,055 (n=20)	p
PD	6%	5%	>0,99
SD	44%	40%	>0,99
PR	44%	50%	0,749
CR	6%	5%	>0,99
ORR	50%	55%	0,515
DCR	94%	95%	>0,99

Tab. 4.21: KRAS-MUT: Ansprechen in Abhängigkeit vom EGFR/CEN7-Verhältnis

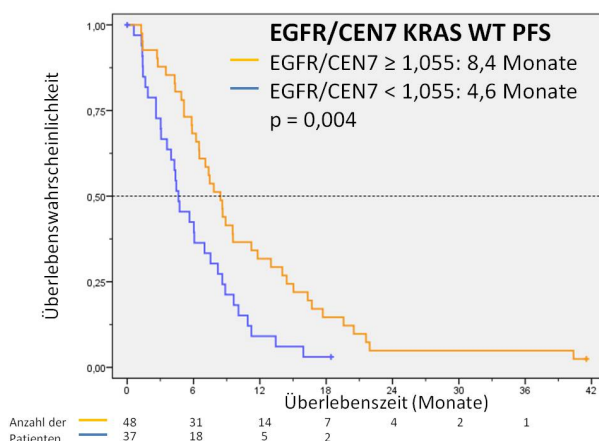


Abb. 4.41: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population

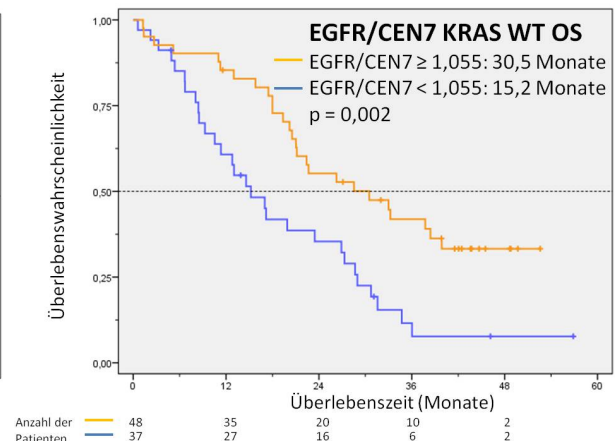


Abb. 4.42: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population

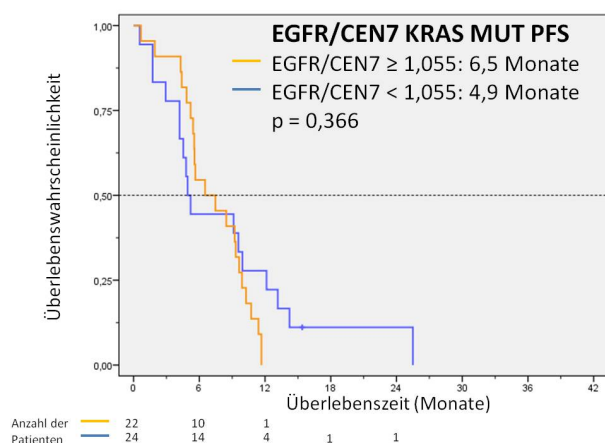


Abb. 4.43: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population

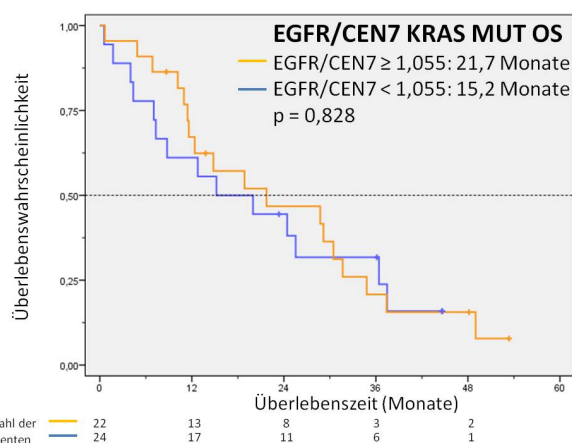


Abb. 4.44: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population

4.4 CA-Repeatlänge und Ansprechen

Die Anzahl der CA-Wiederholungen im Intron 1 des EGFR-Gens wurde mit Hilfe der Fragmentlängenanalyse und einer Sequenzierung homozygoter Klone bestimmt. Von 146 untersuchten Proben konnten 142 ausgewertet werden. 36,6% der Proben (n=52) wiesen einen homozygoten (siehe Abb. 4.45) und 63,4% (n=90) einen heterozygoten Genotyp auf (siehe Abb. 4.46).

Acht verschiedene Allele (15-22 Basenpaare) konnten identifiziert werden. Ein CA-Repeat mit 17 Basenpaaren ist das am häufigsten gemessene Allel (45,3%) und entspricht einer Fragmentlänge von 100 Basen (siehe Abb. 4.45 und 4.47).

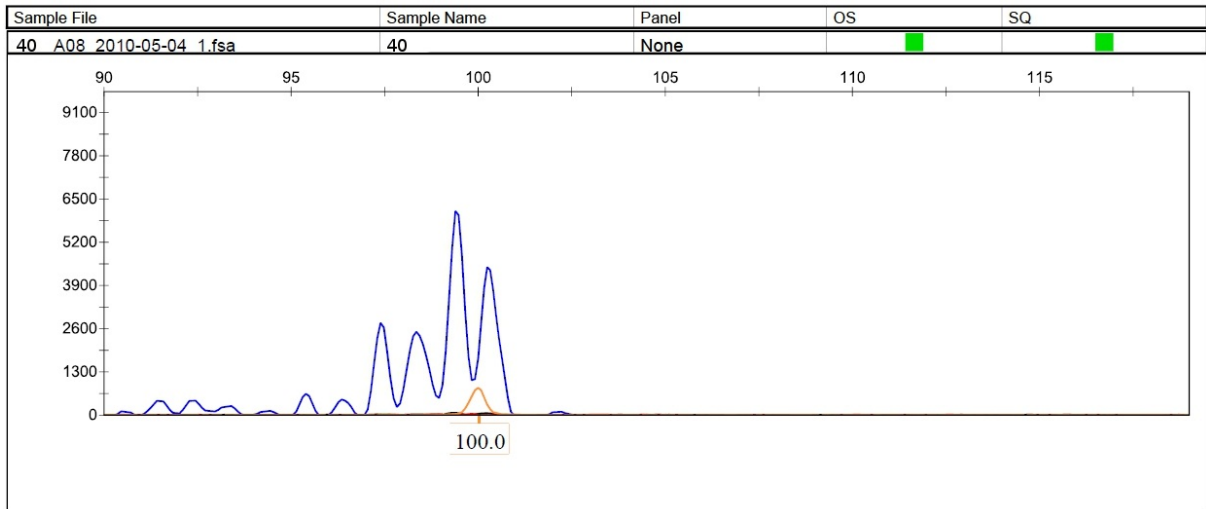


Abb. 4.45: Fragmentlängenanalyse des Klons Nr. 40: Die meisten DNS-Fragmente haben eine Länge von 100 Basen (blaue Kurve). Diese Fragmentlänge wurde durch Vergleich mit dem Standardmarker LIZ[®] (gelbe Kurve) definiert. Es liegt nur ein maximaler Ausschlag vor, da beide Allele des Klons die gleiche Länge haben. Das Präparat ist homozygot.

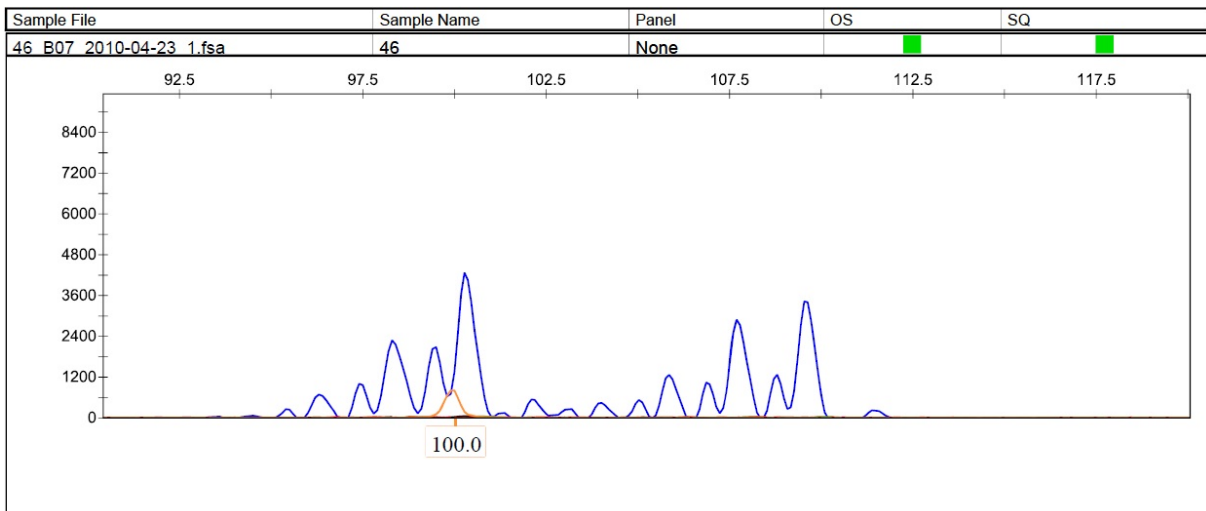


Abb. 4.46: Beispiel für die Fragmentlängenanalyse eines heterozygoten Präparats: Die meisten DNS-Fragmente zeigten eine Länge von 100 und 110 Basen (blaue Kurve, Skalierung am oberen Rand). Diese Fragmentlängen wurde durch Vergleich mit dem Standardmarker LIZ[®] (gelbe Kurve) definiert. Es liegen zwei etwa gleich hohe maximale Ausschläge vor, weil die Allele des Klons zwei unterschiedliche Längen besitzen. Das Präparat ist heterozygot.

Aus den beiden Allelen wurde die Summe gebildet. Mit Hilfe einer ROC-Analyse wurde ein Cut-off bestimmt, der am besten therapieempfindlichere Patienten von therapieresistenteren trennt. Eine Summe beider Allele von 36,5 CA-Repeats wurde als bester Cut-off identifiziert (Sensitivität 45,5%, Spezifität 65,4%). Der Unterschied im Ansprechen der

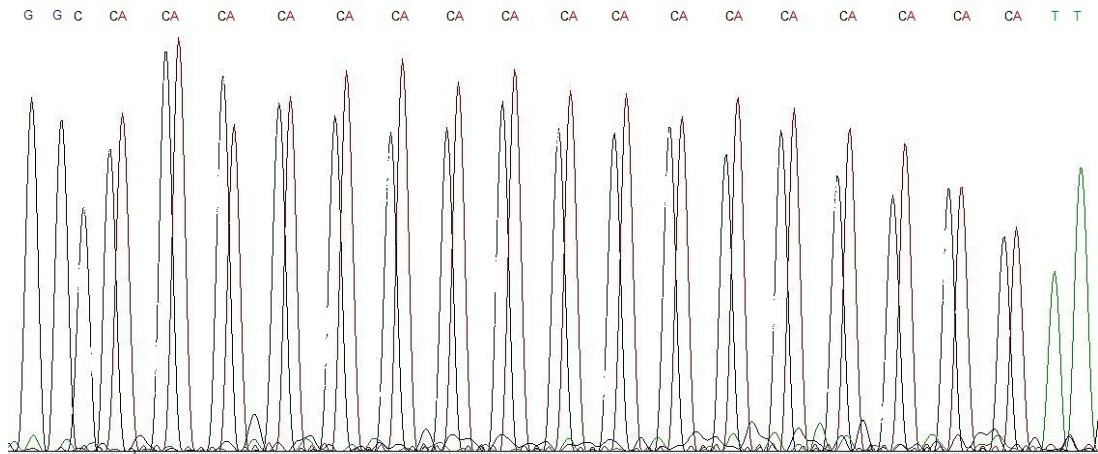


Abb. 4.47: Sequenzierung des homozygoten Klons Nr. 40: Die bereits bekannte Fragmentlänge sind 100 Basen (siehe Abb. 4.45). Diese 100 Basen enthalten 17 CA-Wiederholungen (abzählen in der oberen Leiste). Analog enthält ein Fragment der Länge 110 Basen 5 CA-Wiederholungen mehr, also 22.

durch den Cut-off definierten Gruppen (Intron 1 $< 36,5$ =CA kurz; Intron 1 $\geq 36,5$ =CA lang) erreichte das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ nicht (ORR CA kurz 52,1% vs. CA lang 61,7%, $p=0,347$). Auch die DCR unterschied sich in beiden Gruppen nicht (DCR CA kurz 93,0% vs. CA lang 89,4%, $p=0,517$). Beide Gruppen wiesen ein vergleichbares PFS und OS auf (siehe Abb. 4.48 und 4.49).

CA-Repeat	CA kurz (n=71)	CA lang (n=47)	p
PD	7%	11%	0,517
SD	41%	28%	0,171
PR	47%	55%	0,452
CR	6%	6%	$>0,99$
ORR	52%	62%	0,347
DCR	93%	89%	0,517

Tab. 4.22: Ansprechen in Abhängigkeit von der durchschnittlichen CA-Repeat-Länge

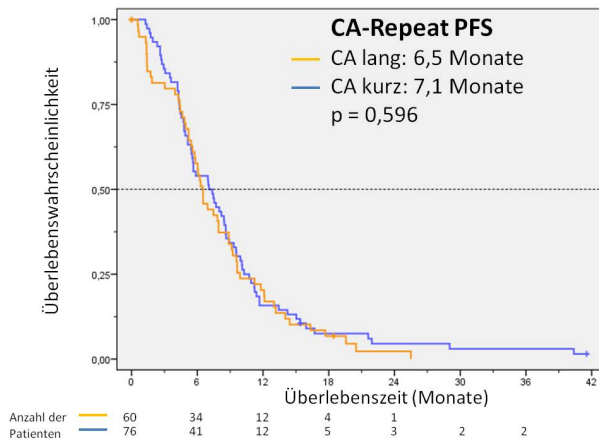


Abb. 4.48: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation

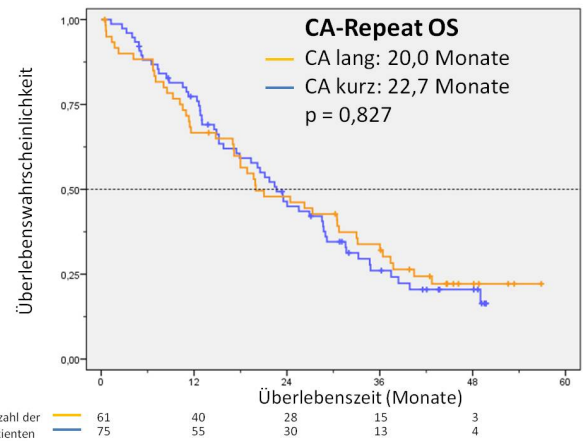


Abb. 4.49: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation

Zusätzlich wurde die Länge des CA-Repeats mit dem Auftreten des akneiformen Exanthems Grad 2 und Grad 3 korreliert. Von 80 Patienten, die eine Grad 2- oder Grad 3-Hauttoxizität entwickelten, hatten 20 Patienten CA lang und 60 Patienten CA kurz (25% vs. 75% $p=0,036$). Damit korrelieren in der CIOX-Studie kurze CA-Repeats mit dem Auftreten der Grad 2 und 3-Hauttoxizität.

4.5 PTEN-Status und Ansprechen

Die Expression des Proteins PTEN wurde immunhistochemisch untersucht. Von 146 gefärbten Präparaten konnten 132 (90,4%) erfolgreich ausgewertet werden. Bei 14 Präparaten war aufgrund einer unzureichenden Fixierung das Gewebe während der aggressiven Mikrowellenbehandlung denaturiert oder hat sich vom Objektträger gelöst.

84 Präparate (63,6%) wurden mit einem Score von ≥ 4 bewertet und waren damit PTEN-positiv. 48 Präparate (36,4%) mit einem Score von 0 bis 3 wiesen eine verminderte Expression auf. Diese wurden als PTEN-negativ definiert und wiesen damit einen PTEN-loss auf. Die Färbung war hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert.

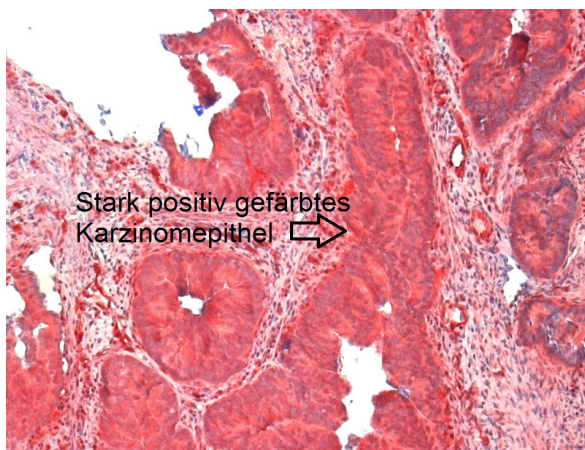


Abb. 4.50: PTEN IHC: starke Rotfärbung
→ hohe Expression,
3 Punkte

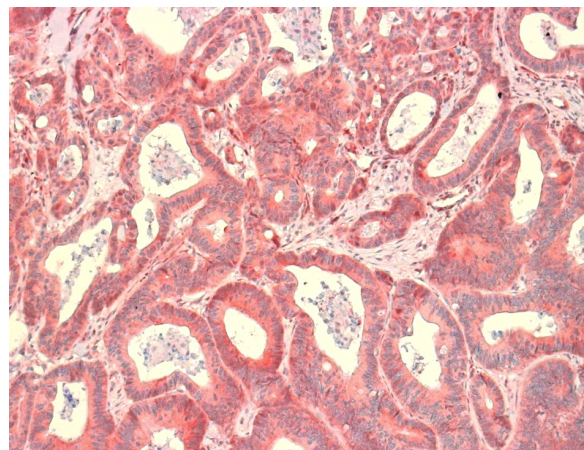


Abb. 4.51: PTEN IHC: mittlere Rotfärbung
→ mittlere Expression,
2 Punkte

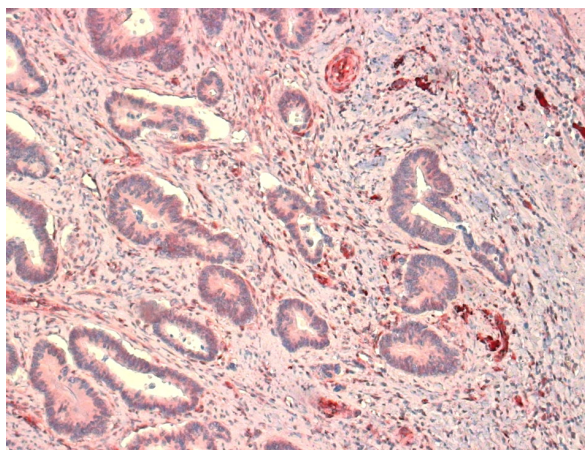


Abb. 4.52: PTEN IHC: schwache Rotfärbung
→ schwache Expression,
1 Punkt

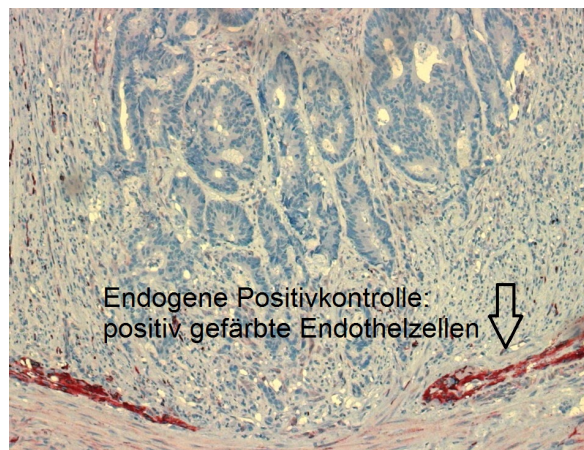


Abb. 4.53: PTEN IHC: keine Rotfärbung
→ keine Expression,
0 Punkte

Von 132 Patienten konnte bei 108 (81,2%) das Ansprechen in Abhängigkeit vom PTEN-Status betrachtet werden. Die ORR mit 57% bei der PTEN-positiven Population (PTEN+) und 50% bei der PTEN-negativen Population (PTEN-) unterschied sich nicht signifikant ($p=0,634$). Dies gilt auch für die DCR (PTEN+ 93% vs. PTEN- 86%, $p=0,384$). Beim progressionsfreien Überleben (PFS PTEN+ 6,3 Monate vs. PTEN- 6,5 Monate, $p=0,473$) und beim Gesamtüberleben (OS PTEN+ 21,0 Monate vs. PTEN- 17,1 Monate, $p=0,506$) konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

PTEN	PTEN+ (n=86)	PTEN- (n=22)	p
PD	7%	14%	0,384
SD	36%	36%	>0,99
PR	52%	45%	0,637
CR	5%	5%	>0,99
ORR	57%	50%	0,634
DCR	93%	86%	0,384

Tab. 4.23: Ansprechen in Abhängigkeit von der PTEN-Expression

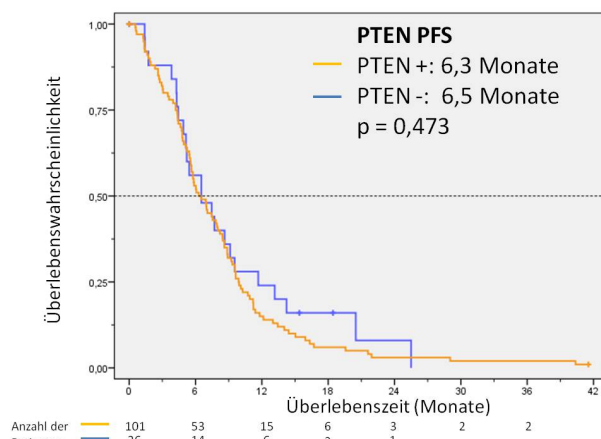


Abb. 4.54: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation

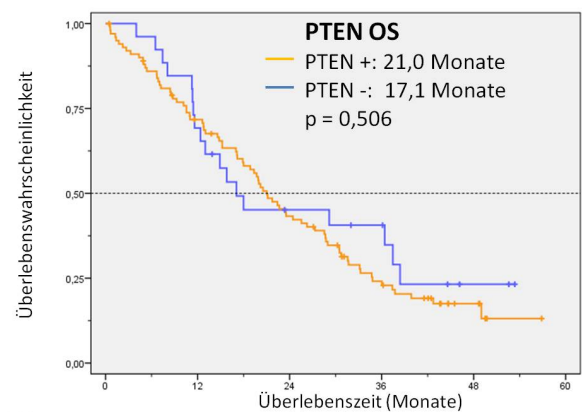


Abb. 4.55: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation

4.6 Definition eines Scores für die Therapieentscheidung

In Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie München (IBE) wurde versucht, aus den gewonnenen Daten einen Score zu entwickeln, auf dessen Grundlage die Entscheidung getroffen werden kann, ob ein Patient mit Cetuximab behandelt werden soll oder nicht. Unter Verwendung einer logistischen Regression wurde ein Vorhersagemodell in Bezug auf das Gesamtansprechen ($ORR = PR + CR$) generiert. Dafür wurde ein linearer Prädiktor (LP) aus den Einflussgrößen

ßen AREG-Expression und EGFR/CEN7-Verhältnis zusammengesetzt. Diese Faktoren haben sich in den statistischen Berechnungen als am besten geeignet für einen Score gezeigt. Der LP wird nach folgender Formel definiert:

$$LP = -7,63 + (0,35 \times \log[AREG]) + (6,58 \times [EGFR/CEN7])$$

Mit Hilfe des LP lässt sich die individuelle Wahrscheinlichkeit für das Therapieansprechen (ORR-P) eines Patienten berechnen. Dazu wird der LP in folgende Formel eingesetzt:

$$ORR-P = \exp(LP) / [1 + \exp(LP)]$$

Die ORR-P kann Werte zwischen 0% und 100% annehmen und diene als kontinuierliche Variable für eine ROC analyse. Um die diskriminative Potenz dieses Scores zu bestimmen, wurde die Fläche unter der ROC-Kurve (Area under the curve, AUC) berechnet. Als Cut-off wurde dabei eine Wahrscheinlichkeit von 50% festgelegt. Für die Fläche unterhalb der Kurve (Area under curve, AUC) ergab sich ein Wert von 0,798 (vgl. Abb. 4.56).

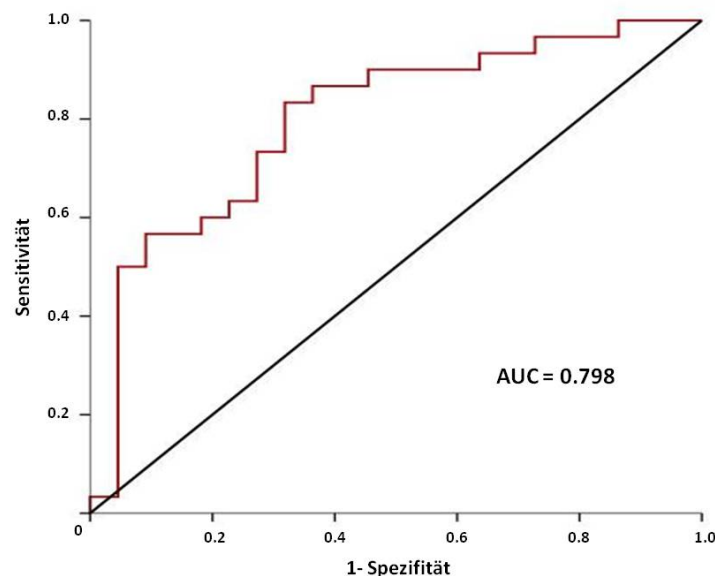


Abb. 4.56: ROC-Kurve für die ORR-P bei einem Cut-off von 50%

Das Ansprechen und Überleben der Patienten wurde im Hinblick auf die ORR-P betrachtet. Aufgrund der Zulassungsbeschränkung von Cetuximab für Patienten mit KRAS-Wildtyp wurde nur diese Population berücksichtigt. Patienten mit einer ORR-P $\geq 50\%$ zeigten ein signifikant besseres Ansprechen und längeres Überleben bei Therapie mit Cetuximab als Patienten mit einer ORR-P $< 50\%$ (ORR $< 50\%$ vs. $\geq 50\%$ 42% vs. 81%, $p=0,009$; PFS 4,6 Monate vs. 8,6 Monate, $p=0,003$, OS 17,2 Monate vs. 38,4 Monate, $p=0,001$, vgl. Tab. 4.24 und Abb. 4.57 und 4.58).

ORR-P	$< 50\%$	$\geq 50\%$	p
PD	16%	5%	0,382
SD	42%	14%	0,064
PR	42%	62%	0,258
CR	0%	19%	0,022
ORR	42%	81%	0,009
DCR	84%	95%	0,382

Tab. 4.24: Ansprechen in Abhängigkeit von der ORR-Wahrscheinlichkeit

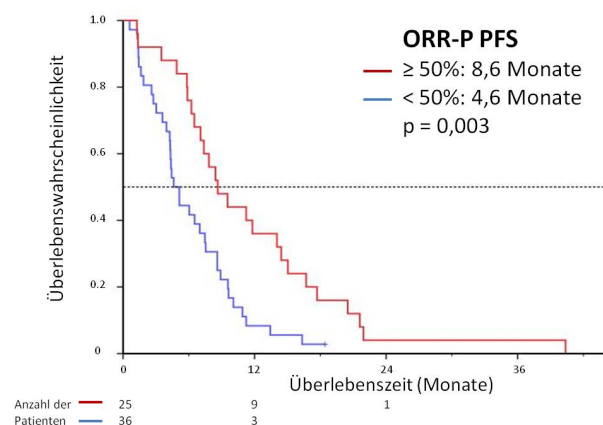


Abb. 4.57: Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Abhängigkeit von der ORR-P

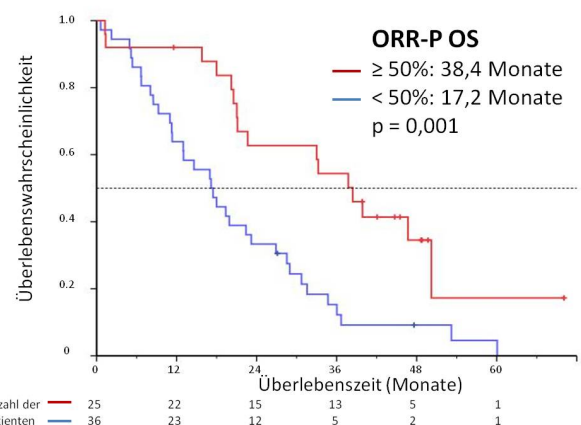


Abb. 4.58: Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der ORR-P

5 Diskussion

Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist eine ubiquitäre Rezeptortyrosinkinase. Diese steuert über verschiedene Signalwege Migration, Proliferation, Invasion und Apoptose sowie DNS-Reparaturmechanismen der Zellen. In der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRK) ist der EGFR der Angriffspunkt für die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Mutationen im KRAS-Gen, einem Faktor des EGFR-Signalwegs, zu einer Daueraktivierung der Signaltransduktion führen und damit zu schlechterem Ansprechen des Tumors gegenüber Cetuximab [6, 42]. Solche Mutationen finden sich bei 30-40% der kolorektalen Karzinome [5, 43]. Die übrigen 60-70% weisen einen KRAS-Wildtyp auf. Doch nur 60% dieser Patienten mit nicht mutierten Tumoren sind empfindlich auf die Antikörpertherapie. Es müssen also noch weitere Faktoren existieren, die den EGFR-Signalweg und damit das Ansprechen auf Cetuximab beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der EGFR-Signalweg anhand der Studienpopulation der CIOX-Studie, die mit Cetuximab plus Irinotecan plus Capecitabin (Arm A) beziehungsweise mit Cetuximab plus Oxaliplatin plus Capecitabin (Arm B) in der Erstlinientherapie behandelt wurde, auf mögliche Biomarker untersucht.

Der EGFR-Signalweg wird unter anderem durch die Liganden des EGF-Rezeptors Amphiregulin und Epiregulin aktiviert. Die Expression dieser Liganden wurde mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR bestimmt und ein Zusammenhang mit dem Therapieansprechen untersucht. Außerdem wurde die Genkopiezahl des EGF-Rezeptors mit Hilfe der FISH-Analyse bestimmt, um das Ausmaß der EGFR-Expression des Tumorgewebes mit dem Therapieansprechen zu vergleichen. Das Intron 1 des EGFR-Gens, das an der

Regulation der EGFR-Expression beteiligt zu sein scheint, wurde sequenziert und ein Zusammenhang der Länge der polymorphen CA-Region mit dem Ansprechen untersucht. Ein Expressionsverlust des Tumorsuppressors PTEN (PTEN loss) kann zu einem Verlust der Hemmung eines EGFR-Signalwegs führen und damit zur schlechteren Cetuximab-Wirkung. Deshalb wurde die Expression des Proteins mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung der Tumorpräparate untersucht.

Bei Biomarkern, die prädiktive Eigenschaften aufwiesen, wurde versucht, Cut-off-Werte zu definieren, die einen Einsatz dieser Marker in der Klinik ermöglichen sollen. Der KRAS-Status der Patienten wurde im Rahmen anderer Untersuchungen erhoben und war zum Zeitpunkt der Auswertung bekannt [30].

5.1 Prädiktive Bedeutung der EGFR-Liganden für das Therapieansprechen

Welchen Einfluss die EGFR-Liganden Amphiregulin und Epiregulin auf die Cetuximab-Wirkung haben, ist noch weitestgehend unerforscht. In dieser Arbeit wurde die Expression beider Moleküle in einer quantitativen Real-Time PCR bestimmt. Drei epitheliale Zelllinien wurden als Positivkontrolle, drei mesenchymale als Negativkontrolle verwendet. Die Expression von EpCAM wurde zur Beurteilung der Reinheit des Tumorgewebes als epithelialer Marker verwendet, was sich als sehr aufwendig herausgestellt hat. Alternativ kann die Isolation des Gewebes mit Hilfe einer Lasermikrodissektion eine hohe Reinheit an Tumorzellen garantieren. Bei einer großen Fallzahl ist diese Methode jedoch sehr zeitaufwändig. Alle Expressionswerte der Liganden wurden im Verhältnis zu zwei Referenzgenen normiert. Bei der RNS-Isolation aus FFPE hat es sich als schwierig erwiesen, eine ausreichend hohe Ausbeute zu erzielen. Dies reduzierte das untersuchte Patientenkollektiv auf 113 Proben. Da die RNS-Ausbeute aus den als Kontrolle verwendeten Zelllinien um ein Vielfaches größer war, ist die Ursache wohl in der Fixierung und Lagerungszeit der Präparate zu suchen. Für eine routinemäßige Expressionsbestimmung in der Klinik sollte

das Untersuchungsgewebe also möglichst frisch und gut fixiert sein.

Diese Dissertation konnte zeigen, dass Patienten mit hohen AREG- und EREG-RNS-Werten, also einem hohen Expressionsniveau, ein besseres Ansprechen und längere Überlebenszeiten bei der Therapie mit Cetuximab zeigten. Für beide Moleküle konnten erstmals Cut-off-Werte definiert werden. Für AREG wurde ein Expressionsniveau von mehr als 8,855 im Verhältnis zum Referenzgen als bester Cut-off bestimmt (Sensitivität 56,9%, Spezifität 75,6%). Für EREG lag dieser Wert bei 31,655 (Sensitivität 62,1%, Spezifität 73,2%). Patienten mit höherer Ligandenexpression als der Cut-off weisen ein signifikant besseres Ansprechen auf (AREG: ORR 45% vs. 77%, $p=0,002$, EREG: ORR 42% vs. 77%, $p=0,001$). Diese Ergebnisse bestätigen die in früheren Studien gewonnenen Erkenntnisse [22, 24]. Khambata-Ford et al. untersuchten erstmals die AREG- und EREG-Expression bei Patienten mit mKRK [24]. Auch hier zeigten Patienten mit hohen AREG- und EREG-Expressionen eine bessere Krankheitskontrollrate und ein längeres progressionsfreies Überleben. Jedoch bestand das Untersuchungsmaterial ausschließlich aus Biopsien verschiedener Metastasenlokalisationen. Die Übereinstimmung der Expressionsniveaus von Primärtumor und Metastase wurde nicht untersucht. Als Grenzwert wurde der Median festgesetzt. Ein Cut-off wurde nicht bestimmt.

Tejpar et al. untersuchten bei rund 200 Patienten die AREG- und EREG-Expression an archiviertem Material verschiedener Studien (EVEREST, BOND, SALVAGE und BABEL), die in der Zweit- und Drittlinientherapie mit Cetuximab behandelt wurden [22]. Bei KRAS-Wildtyppatienten konnten sie einen Zusammenhang mit dem Ansprechen und Überleben feststellen. In der Gruppe der KRAS-Mutierten sprach nur ein Patient auf die Cetuximab-Therapie an. Die Arbeitsgruppe hat jedoch keinen Cut-off-Wert angegeben. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der KRAS-Status der Patienten berücksichtigt [30]. In der KRAS-WT-Gruppe hat sich gezeigt, dass Patienten mit hohen AREG- und EREG-Expressionslevels signifikant besser auf die Therapie mit Cetuximab ansprechen und längere Überlebenszeiten aufweisen. In der Gruppe der KRAS-mutierten Patienten konnte das Signifikanzniveau nur bei EREG in der ORR erreicht werden. Jedoch zeigt sich eine eindeutige Tendenz zu besserem Ansprechen und längerem Überleben bei den Patienten mit hoher Ligandenexpression (AREG: ORR 43% vs. 68%, $p=0,13$; PFS 5,5

Monate vs. 9,2 Monate $p=0,067$; OS 12,8 Monate vs. 28,7 Monate, $p=0,23$; EREG: ORR 38% vs. 81%, $p=0,01$; PFS 5,5 Monate vs. 9,3 Monate, $p=0,33$, OS 18,9 Monate vs. 20 Monate, $p=0,33$). Das Signifikanzniveau ist vermutlich aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht erreicht worden (AREG KRAS-MUT: 21 vs. 19 Patienten, EREG KRAS-MUT: 24 vs. 16 Patienten).

Die Wirkung von Cetuximab entsteht durch kompetitive Verdrängung anderer Liganden von der Ligandenbindungsstelle des EGF-Rezeptors. Die in dieser Arbeit bestimmte höhere AREG- und EREG-Expression führt jedoch nicht zu einer Verdrängung von Cetuximab und damit schlechterer Wirksamkeit des Präparats, da bei der üblichen Dosierung von Cetuximab eine mehrfache Sättigung des Rezeptors erreicht wird. Vielmehr scheinen Tumore mit erhöhter Ligandenexpression besonders EGFR-abhängig zu sein, sodass sie eine EGFR-Inhibition schlechter über alternative Mechanismen kompensieren können und dadurch empfindlicher auf die Antikörpertherapie sind. Die Expressionserhöhung wird wahrscheinlich vom Tumor selbst reguliert, um ein vermehrtes Wachstum zu stimulieren. Das untersuchte Kollektiv ist mit 113 Patienten relativ klein. Die Gültigkeit der in dieser Arbeit bestimmten Cut-offs für größere Patientengruppen muss noch überprüft werden. Dennoch sind die Expressionslevels von AREG und EREG die derzeit wohl vielversprechendsten prädiktiven Faktoren für die Patientenselektion bei der Therapie mit EGFR-Antikörpern und waren in dieser Studie potentere prädiktive Faktoren als der KRAS-Status [30]. Aufgrund der guten prädiktiven Eigenschaften wurde die AREG-Expression zusammen mit dem EGFR/CEN7-Verhältnis als Einflussgröße für die Berechnung der individuellen Ansprechwahrscheinlichkeit eingesetzt. Der sich daraus ergebende Score soll die Therapieentscheidung objektivieren und erleichtern (siehe Kapitel 5.5).

5.2 Einfluss der EGFR-Genkopiezahl auf das Ansprechen

Die EGFR-Genkopiezahl (EGFR-GCN) wurde mit Hilfe der FISH-Methode bestimmt. Es wurde ein in der Routinediagnostik etabliertes Protokoll verwendet, das gut reproduzierbar ist. Alle Patienten wiesen eine Vermehrung des EGFR-Gens mit mehr als zwei Kopien pro Zellkern auf. Keine der Proben zeigte eine Eusomie. Bei 26 Präparaten ließ sich wiederholt keine Hybridisierung durchführen. Eine mögliche Ursache könnte in der Fixierung des Gewebes liegen. Da es keine exakten Vorgaben bei der Durchführung der Fixierung von reseziertem Gewebe gibt, unterliegt die Qualität des Untersuchungsmaterial starken Schwankungen. Jedes der verschiedenen Pathologischen Institute, aus denen das Untersuchungsmaterial stammt, hat dabei eigene Fixierungsvorgänge. Auch die Dicke des Paraffinschnitts hat Einfluss auf das Ergebnis der Hybridisierung. Ist der Schnitt zu dick, überlappen die Zellkerne und lassen sich nicht genau abgrenzen. Das Gewebe quillt vermehrt auf, sodass die Beurteilbarkeit eingeschränkt wird. Bei zu dünnen Schnitten besteht andererseits die Gefahr, einen Großteil der Zellkerne durch zu schneiden und so falsch niedrige Signale zu zählen. Mit einer Schnittdicke von 3-4µm wurde versucht, ein optimales Ergebnis zu erzielen.

Die EGFR-GCN wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Aufgrund von unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und nicht einheitlicher Beurteilungskriterien sind die Untersucher zu unterschiedlichen Ergebnissen gekommen. Beim Bronchialkarzinom konnten die prädiktiven Eigenschaften der EGFR-GCN bereits nachgewiesen werden [8, 19]. In der Therapie des mKRK ist die Datenlage bisher nicht eindeutig.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der EGFR-GCN und dem Ansprechen der Patienten hergestellt werden. Mit 3,82 EGFR-Kopien pro Zellkern (Sensitivität 50,9%, Spezifität 73,3%) konnte ein Cut-off definiert werden, der signifikant therapieresistentere Patienten von therapieempfindlicheren trennt (EGFR-GCN <3,82 vs. EGFR-GCN ≥3,82: ORR 44% vs. 69%, p=0,022). Ähnliche Ergebnisse konnten auch Moroni et al. erzielen. Die Arbeitsgruppe bestimmte die EGFR-GCN mittels FISH und setzte

im Vorfeld einen Wert von ≥ 3 EGFR-Signalen pro Zellkern als eine erhöhte GCN fest. Patienten mit mehr als drei Signalen zeigten ein signifikant besseres Ansprechen [31]. Das untersuchte Patientenkollektiv war jedoch sehr inhomogen, weil es aus verschiedenen Studien stammte und mit Cetuximab oder Panitumumab als Monotherapie, in Kombination mit Irinotecan, als Erstlinien- oder Drittlinientherapie behandelt wurde. Das Patientenkollektiv war darüber hinaus mit 31 Patienten sehr klein.

Im Gegensatz dazu untersuchte die Gruppe um Lenz die EGFR-GCN mit Hilfe der absoluten Quantifizierung in der PCR im Verhältnis zum Referenzgen VEST1 und konnte weder einen Zusammenhang mit dem Ansprechen noch mit dem progressionsfreien Überleben herstellen. Es bestand jedoch ein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben [25]. Im Rahmen dieser Studie wurden alle Patienten einheitlich mit Cetuximab behandelt. Jedoch zeigte das Kollektiv starke Unterschiede in der Vortherapie.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der oben genannten Studien beruhen möglicherweise auf der Verwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden. Im Gegensatz zur FISH ist die PCR anfälliger für Verunreinigung des Tumorgewebes mit Normalgewebe, was zu falsch niedrigen EGFR-GCN-Werten führt. Um die Reinheit des Gewebes zu garantieren, müsste dieses unter Zuhilfenahme der Lasermikrodissektion isoliert werden. Ob dies bei Lenz et al. durchgeführt wurde, geht aus der Publikation nicht hervor.

Sartore-Bianchi et al. haben mit der FISH-Analyse den EGFR-Status von Patienten bestimmt, die mit Panitumumab in Kombination mit bestmöglichen unterstützenden Maßnahmen (best supportive care, BSC) versus BSC allein behandelt wurden [37]. Diese Arbeitsgruppe hat erstmals 2,47 EGFR-Kopien pro Zellkern als Cut-off definieren können. Patienten mit einer niedrigeren EGFR-GCN als 2,47 zeigten ein kürzeres PFS und OS. Keiner dieser Patienten zeigte ein Ansprechen auf die Antikörpertherapie. Die Ergebnisse dieser Gruppe sind ähnlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Jedoch gibt es bisher noch keine Untersuchungen, ob Panitumumab und Cetuximab, die unterschiedlichen Antikörper mit gleichem Wirkmechanismus sind, als gleichwertig angesehen werden können. Es lässt sich bisher nicht beurteilen, ob die Ergebnisse für Panitumumab auch für Cetuximab anwendbar sind.

Die Gruppe um Cappuzzo et al. untersuchte 85 Patienten mit Hilfe der FISH-Methode und

definierte Patienten mit weniger als 2,92 EGFR-Kopien pro Zellkern als EGFR-negativ, Patienten mit mehr Kopien als EGFR-positiv. Bezogen auf die Ansprechrate und die Zeit bis zur Progression zeigten die EGFR-positiven Patienten signifikant bessere Werte. Die Arbeitsgruppe wendete die Kriterien aller oben beschriebenen Studien auf ihr Patientenkollektiv an und konnten ihren Cut-off von 2,92 Kopien pro Zellkern als den mit der höchsten Sensitivität (58,6%) und Spezifität (93,3%) bestimmen [7]. Auf welche Weise dieser Cut-off jedoch definiert wurde, geht aus der Arbeit nicht hervor. Angewendet auf das Patientenkollektiv der CIOX-Studie konnten die Sensitivitäts- und Spezifitätswerte nicht reproduziert werden (CIOX-Kollektiv: Sensitivität 79,2%, Spezifität 37,8%).

Bereits früher durchgeführte Studien zur EGFR-Genamplifikation und -Expression wiesen auf starke Inhomogenität beim Kolonkarzinom hin [33, 38]. Eine Erhöhung der EGFR-Kopienzahl wurde bei 10-30% der Tumorzellen beschrieben [24, 26, 31]. Möglicherweise spiegelt sich diese starke Variabilität der EGFR-GCN in den unterschiedlichen Cut-off-Werten wider, die bisher bestimmt werden konnten. Sicherlich haben auch die verschiedenen Vortherapien der Patienten Einfluss auf die Ergebnisse, da in keiner der oben beschriebenen Studien Cetuximab in der Erstlinienbehandlung eingesetzt wurde.

Für den Einsatz der EGFR-GCN in der Klinik ist es notwendig, eine einheitliche, reproduzierbare Bestimmungsmethode zu etablieren, da wie oben gezeigt, verschiedene Methoden zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Die FISH-Analyse scheint gut geeignet zu sein, weil sie wenig anfällig für Kontaminationen mit Normalgewebe ist. Die fixierte DNS ist ebenfalls stabiler als die in der IHC nachgewiesenen Proteine. Bei der Therapie des Mamma-Karzinoms ist die FISH-Analyse des Her2/neu-Gens bereits fester Bestandteil der Diagnostik.

Neben der EGFR-GCN scheint auch das Verhältnis des EGFR-Gens zum Chromosom 7 (EGFR/CEN7) eine Rolle beim Ansprechen auf Cetuximab zu spielen. Auch hier konnte ein Cut-off definiert werden. Patienten mit einem größeren EGFR/CEN7-Verhältnis als 1,055 (Sensitivität 67,9%, Spezifität 57,8%) zeigten ein besseres Ansprechen auf die Antikörpertherapie mit Cetuximab (ORR 39% vs. 65%, $p=0,014$). Daraus lässt sich schließen, dass ein Unterschied besteht, ob die EGFR-GCN durch alleinige Vermehrung des EGFR-Gens oder durch Vermehrung des gesamten Chromosoms 7 entsteht. Der Cut-off zeigt,

dass bereits eine leichte Vermehrung des EGFR-Gens im Verhältnis zum Chromosom 7 zu einem besseren Ansprechen führt. Polysomien des gesamten Chromosoms scheinen jedoch ungünstiger zu sein.

Tumore mit erhöhter EGFR-GCN beziehungsweise einem erhöhten EGFR/CEN7-Verhältnis scheinen ihr Wachstum hauptsächlich EGFR-abhängig zu steuern. Eine Blockade des EGFR-Signalwegs kann möglicherweise schlechter über andere Signalwege kompensiert werden. Eine vermehrte Cetuximab-Empfindlichkeit ist die Folge.

Interessanterweise zeigten Patienten im Cetuximab plus CAPOX-Arm bessere Ansprech-raten als Patienten im Cetuximab plus CAPIRI-Arm. Möglicherweise ist dies im Wirk-mechanismus von Oxaliplatin begründet. Im Gegensatz zum Topoisomerase-Hemmstoff Irinotecan beruht die zytotoxische Wirkung von Oxaliplatin auf DNS-Quervernetzung in der Zelle. EGFR-abhängige Tumore steuern die DNS-Reparaturmechanismen hauptsächlich über den EGFR-Signalweg [44]. Ist der EGFR-Signalweg durch Cetuximab gehemmt, können die DNS-Schäden nicht repariert werden, wodurch Oxaliplatin besser wirken kann. Der Einfluss einer KRAS-Mutation auf das Ansprechen der Patienten wurde ebenfalls betrachtet [30]. Während in der Population der KRAS-mutierten Patienten die EGFR-GCN keinen Einfluss auf das Ansprechen und Überleben hatte, zeigen die Patienten in der KRAS-Wildtyp-Gruppe ein signifikant besseres Ansprechen bei hohen EGFR-GCN ($p=0,01$). Das EGFR/CEN7-Verhältnis erreicht hier sogar im Ansprechen und Überleben signifikante Ergebnisse ($\text{EGFR/CEN7} < 1,055$ vs. $\text{EGFR/CEN7} \geq 1,055$: ORR 33% vs. 71%, $p=0,004$; PFS 4,6 Monate vs. 8,4 Monate, $p=0,004$, OS 15,2 Monate vs. 30,5 Monate, $p=0,002$).

Aufgrund der guten prädiktiven Eigenschaften des EGFR/CEN7-Verhältnisses wurde dieser Faktor für die Berechnung der ORR-Wahrscheinlichkeit herangezogen. Der so entwickelte Score soll für die Therapieentscheidung herangezogen werden (siehe Kapitel 5.5).

Vor Einschluss der Patienten in die CIOX-Studie wurde die EGFR-Expression des Tumors in einer immunhistochemischen Untersuchung bestimmt. Wie schon in mehreren Studien zuvor, konnte auch in der vorliegenden Dissertation kein Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression in der IHC und dem Ansprechen oder Überleben hergestellt werden [7, 9, 15, 25, 34]. In einer zusätzlich durchgeführten zentralen Untersuchung des

EGFR-IHC-Status der Patienten der CIOX-Studie konnte festgestellt werden, dass keine Korrelation mit dem im Vorfeld der Studie dezentral bestimmten EGFR-Status in der IHC besteht. Das verdeutlicht erneut die Notwendigkeit einer standardisierten Methode mit einheitlichen Durchführungs- und Auswertungsmethoden. Da wiederholt gezeigt werden konnte, dass die EGFR-Expression in der IHC nicht im Zusammenhang mit der Cetuximab-Empfindlichkeit steht, sollte trotz der, in der Fachinformation zu Cetuximab beschränkten Anwendung auf EGFR-exprimierende Tumore der Antikörper auch bei EGFR-IHC-negativen Patienten angewendet werden. Alternativ könnte die EGFR-Expression anstatt in der IHC auch mit Hilfe der FISH-Analyse bestimmt werden.

5.3 Korrelation des CA-Repeats mit der Hauttoxizität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der CA-Wiederholungen im Intron 1 des EGFR-Gens bestimmt. Durch zusätzliche Klonierung homozygoter Proben mit anschließender Sequenzierung und Fragmentlängenanalyse wurde versucht, höchstmögliche Genauigkeit bei der Längenbestimmung des CA-Polymorphismus zu erreichen. Aus der Länge beider Allele wurde die Summe gebildet. Mit Hilfe einer ROC-Analyse konnte die Summe von 36,5 CA-Wiederholungen als Cut-off bestimmt werden. Beim Vergleich des Cut-offs mit dem Ansprechen und Überleben konnte jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden (CA kurz vs. CA lang: ORR 52% vs. 62%, $p=0,347$; PFS Median 7,1 Monate vs. 6,5 Monate, $p=0,596$; OS Median 22,7 Monate vs. 20 Monate, $p=0,827$). Dies bestätigt bereits früher durchgeführte Untersuchungen am Bronchialkarzinom [21]. Bei der Therapie des NSCLC mit selektiven klein-molekularen Inhibitoren der Tyrosinkinase des EGFR konnten Huang et al. jedoch feststellen, dass die Länge des CA-Polymorphismus mit dem Auftreten des akneiformen Exanthems als Nebenwirkung der Antikörpertherapie assoziiert ist [21]. Patienten mit kurzen CA-Repeats entwickelten frühe Hauttoxizitäten 2. und 3. Grades. Diese Ergebnisse konnten von Graziano et al. am Kolonkarzinom bestätigt

werden [18]. Hier zeigten Patienten mit einem als Short/Short definierten Genotyp (< 17 CA-Wiederholungen) ebenfalls ein häufigeres Auftreten der Hauttoxizitäten 2. und 3. Grades ($p < 0,001$). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten Patienten mit kurzen CA-Wiederholungen ($< 36,5$ CA-Wiederholungen) vermehrt Grad 2- und 3-Hauttoxizitäten ($p = 0,036$).

Obwohl der Intron 1-Polymorphismus mit dem Auftreten des akneiformen Exanthems assoziiert ist und die Entwicklung des Exanthems mit einer besseren Prognose verbunden ist, besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Intron 1-Polymorphismus und dem Ansprechen. Gründe für den fehlenden Zusammenhang sind bisher nicht eindeutig geklärt.

Eine Untersuchung größerer Kollektive mit einer Aufteilung in die verschiedenen Genotypen des Polymorphismus wäre notwendig, um genauere Erkenntnisse zu erhalten. Mit 142 Patienten ist das Kollektiv der CIOX-Studie aber zu klein, um in den Subgruppen valide Ergebnisse zu erhalten. In dieser Arbeit ist es jedoch zum ersten Mal gelungen, einen Zusammenhang zwischen dem Intron 1-Polymorphismus des EGFR-Gens und dem Auftreten der Cetuximab-induzierten Hauttoxizität in der Erstlinienbehandlung des mKRK nachzuweisen. Somit ist der Intron 1-Polymorphismus zwar kein Prädiktor des Ansprechens, jedoch ein Prädiktor der Hauttoxizität.

5.4 Einfluss der PTEN-Expression auf das Ansprechen

Die Expression des Proteins PTEN wurde immunhistochemisch bestimmt. Um eine möglichst große Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden die Präparate anhand eines publizierten Scores nach Loupakis et al. in PTEN-positiv und PTEN-negativ eingeteilt [27]. Es wurde festgelegt, dass PTEN-negative Patienten einen Expressionsverlust (PTEN-loss) aufweisen. Ein PTEN-loss konnte bei 36% der Patienten nachgewiesen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen ist auch die Gruppe um Frattini gekommen, die einen Verlust

der PTEN-Expression bei 41% ihrer Patienten fanden [15]. Keiner dieser Patienten mit PTEN-loss sprach bei Frattini auf die Antikörpertherapie an. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nicht bestätigt werden. Weder beim Ansprechen noch beim Überleben konnte ein Zusammenhang mit dem PTEN-Status der Studienpopulation hergestellt werden.

Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise in der Untersuchungsmethode zu finden. Da die Bestimmung der PTEN-Expression keine Routineuntersuchung ist, gibt es kein einheitliches Vorgehen bei der Durchführung. Auch für die Auswertung der Immunhistochemie (IHC) wurden bei beiden Arbeiten unterschiedliche Kriterien herangezogen. Außerdem hat die Gruppe um Frattini die Untersuchung an nur 27 Patienten durchgeführt. Diese waren in unterschiedliche Studien eingeschlossen und erhielten Cetuximab nicht nur in der Erstlinienbehandlung, sondern auch als Zweit- und Drittlinien-Therapie, was die Population sehr inhomogen machte.

Die Gruppe um Loupakis, aus deren Arbeit der Bewertungsscore für den PTEN-Status entnommen wurde, hat 102 Patienten untersucht und bei 42% einen Verlust der PTEN-Expression feststellen können [27]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte diese Arbeitsgruppe keinen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen und dem PTEN-Status des Primärtumors feststellen. Lediglich ein Zusammenhang mit dem Expressionsverlust bei Metastasen konnte bestätigt werden. Doch nur bei 60% der Gewebepaare lag eine Übereinstimmung der PTEN-Expression zwischen Primärtumor und Metastase vor. Folglich kann bei PTEN-loss der Metastase nur bedingt auf das Ansprechen des Primärtumors geschlossen werden. Für molekulargenetische Untersuchungen liegen außerdem häufiger Gewebeproben des Primärtumors vor, die in einer Koloskopie leichter zu erhalten sind als Gewebe von Tumormetastasen.

Trotz der Verwendung des gleichen Scores für die Beurteilung der IHC wie Loupakis et al. gibt es Unterschiede in der Auswertung. Während Loupakis et al. auch eine stabile Erkrankungssituation mit einer Dauer von sechs Monaten als Ansprechen gewertet haben, wurde in der vorliegenden Arbeit das Ansprechen ausschließlich nach den RECIST-Kriterien definiert.

Die IHC ist eine aufwändige Methode mit viel Spielraum für Variabilität. Der Einsatz

des PTEN-Antikörpers war nur nach einer sehr aggressiven Mikrowellenbehandlung des Gewebes bei einem hohen pH-Wert möglich. Bei diesen extremen Bedingungen besteht die Gefahr, das Gewebe zu denaturieren und dadurch mögliche Antigene für den Antikörper zu zerstören. Als Folge erhält man eine falsch hohe Rate an PTEN-negativen Patienten, was die statistische Analyse verfälschen kann. Eine einheitliche Durchführung mit Verwendung eines exakt definierten Bewertungssystems könnte zu einer besseren Übereinstimmung der Untersuchungsergebnisse führen. In der Therapie des Mamma-Karzinoms wurden solche Protokolle für die PTEN-Expressionsbestimmung bereits vorgeschlagen [35].

Ein weiteres Problem könnte in der dichotomen Aufteilung der Patienten in eine PTEN-positive und eine PTEN-negative Population liegen. Möglicherweise könnte eine Analyse der Daten unter Verwendung einer kontinuierlichen Variable signifikante Unterschiede im Ansprechen zeigen.

Alternativ wäre die Untersuchung der PTEN-Genamplifikation mittels FISH denkbar. Eine griechische Forschungsgruppe hat an 72 Patienten mit mKRK die PTEN-Expression mit Hilfe der IHC und die Genamplifikation mit Hilfe der FISH untersucht [34]. Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten ohne PTEN-Amplifikation zu einem besseren Ansprechen und längeren Zeiten bis zur Progression neigen ($p=0,042$). Dieser Zusammenhang konnte hingegen in der IHC nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beim Kollektiv der CIOX-Studie kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen und Überleben und dem PTEN-Expressionsverlust in der Immunhistochemie besteht. Durch Vereinheitlichung der immunhistochemischen Methode oder Etablieren neuer Untersuchungsmöglichkeiten wie zum Beispiel der FISH können möglicherweise weiterführende Ergebnisse erzielt werden.

5.5 ORR-Wahrscheinlichkeit als Entscheidungs-Score

Mit Hilfe der logistischen Regression konnte in Kapitel 4.6 die individuelle ORR-Wahrscheinlichkeit eines Patienten berechnet werden. Als Einflussgrößen für das Ansprechen und Überleben wurden dabei die AREG-Expression und das EGFR/CEN7-Verhältnis ein-

gesetzt. KRAS-Wildtyp-Patienten mit einer ORR-P von $\geq 50\%$ zeigten hier ein signifikant besseres Ansprechen und längere Überlebenszeiten als Patienten mit einer ORR-P $< 50\%$. Mit einer AUC von 0,798 in der ROC-Analyse zeigt die ORR-P dabei auch objektiv eine gute diskriminative Potenz. Die ORR-P kann als Score verwendet werden, um Patienten, die wahrscheinlich besser auf eine Cetuximab-Therapie ansprechen werden zu identifizieren. Zusätzlich zum KRAS-Status des Patienten kann die ORR-P als Entscheidungshilfe im klinischen Alltag herangezogen werden. Jedoch sollte die Gültigkeit dieses Scores noch an größeren Patientenkollektiven bestätigt werden.

6 Zusammenfassung

Der gegen EGFR gerichtete monoklonale Antikörper Cetuximab eröffnet die Möglichkeit einer individualisierten und zielgerichteten Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Die für die Therapieoptimierung notwendige Selektion geeigneter Patienten soll anhand molekulargenetischer Faktoren geschehen, die prädiktiv für das Therapieansprechen sind. Das Proto-Onkogen KRAS konnte bereits als prädiktiver Faktor identifiziert werden, was zu einer Zulassungsbeschränkung von Cetuximab für Patienten mit einem KRAS-Wildtyp führte. Doch nur 60% der durch KRAS selektierten Patienten sprechen auf Cetuximab an. Deshalb ist es notwendig, weitere prädiktive Biomarker zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden am Patientenkollektiv der CIOX-Studie mehrere mögliche Faktoren untersucht. Die Expression der EGFR-Liganden Amphiregulin und Epiregulin wurde in einer quantitativen Real-Time PCR gemessen und mit dem Ansprechen und Überleben der Patienten verglichen. Für beide Liganden konnten Cut-off-Werte definiert werden (AREG 8,855, EREG 31,655). Sowohl für AREG als auch für EREG gilt, dass höhere Expressionslevels als der Cut-off mit einem besseren Ansprechen und längeren Überleben assoziiert sind. Die EREG-Expression trennt sogar in der KRAS-mutierten Patientengruppe signifikant therapieresistentere von therapieempfindlicheren Patienten bezogen auf die ORR. Folglich ist die Expression der EGFR-Liganden sehr gut als Prädiktor für die Antikörpertherapie geeignet und kann zur Patientenselektion herangezogen werden.

Die EGFR-Genkopiezahl wurde mit Hilfe der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung bestimmt. Ein Cut-off von 3,82 EGFR-Genkopien pro Zellkern wurde mit Hilfe der ROC-Analyse identifiziert. Es konnte festgestellt werden, dass Patienten mit mehr EGFR-Kopien pro

Zellkern als der Cut-off signifikant besser auf die Antikörpertherapie ansprechen. Dieser Unterschied lag vor allem bei Patienten vor, die zusätzlich zu Cetuximab mit Oxaliplatin behandelt wurden. Die EGFR-Genkopiezahl in der FISH eignet sich also als prädiktiver Faktor für die Antikörpertherapie und stellt eine zuverlässigere Methode dar, als die bisher übliche Bestimmung der EGFR-Expression in der Immunhistochemie.

Auch das Verhältnis des EGFR-Gens zu Chromosom 7, auf dem das Gen lokalisiert ist, hat sich als nützlicher prädiktiver Faktor erwiesen. Patienten, bei denen das Verhältnis einen Wert von 1,055 übersteigt, zeigen ein signifikant besseres Ansprechen und längeres Überleben bei Therapie mit Cetuximab.

Mit Hilfe einer Fragmentlängenanalyse und Sequenzierung wurde im Intron 1 des EGFR-Gens die Länge der Wiederholungen des Dinucleotids CA bestimmt. Ein Zusammenhang zwischen der Länge des Polymorphismus und dem Ansprechen und Überleben der Patienten konnte jedoch nicht hergestellt werden. Dieser Parameter eignet sich im Rahmen der CIOX-Studie nicht als prädiktiver Faktor für die Patientenselektion.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass das Auftreten von Hauttoxizitäten (Grad 2 und 3) als Nebenwirkung der Cetuximab-Therapie mit dem Vorkommen kürzerer CA-Polymorphismen beim Patienten assoziiert ist (25% vs. 75%; $p=0,036$). Der Intron 1-Polymorphismus eignet sich also als prädiktiver Faktor für das Auftreten des akneiformen Exanthems, das derzeit als der beste klinisch prädiktive Faktor für die Antikörpertherapie gilt.

Die Expression des Tumorsuppressors PTEN wurde mit Hilfe der Immunhistochemie bestimmt. Anhand eines Scores nach Loupakis et al. wurden die Präparate in PTEN-positiv und PTEN-negativ eingeteilt [27]. Ein Zusammenhang des PTEN-Status mit dem Ansprechen und Überleben der Patienten wurde untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen nachgewiesen werden. Prädiktive Eigenschaften der PTEN-Expression konnten nicht nachgewiesen werden.

Aus der AREG-Expression und dem EGFR/CEN7-Verhältnis konnte mit Hilfe einer logistischen Regression die individuelle Ansprechwahrscheinlichkeit der Patienten berechnet werden. Bei einem Wert über 50% zeigen die Patienten ein signifikant besseres Ansprechen und längere Überlebenszeiten. Dieser Score könnte im klinischen Alltag bei der Therapieentscheidung herangezogen werden und die bisherige Selektion der Patienten anhand des

KRAS-Status erweitern.

Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs der CIOX-Studie sind jedoch weitere Untersuchungen an größeren Studienpopulationen, eventuell mit einem Cetuximab-freien Kontrollarm, notwendig, um die Ergebnisse dieser Arbeit und die Validität und Reproduzierbarkeit der definierten Cut-offs und des Scores zu überprüfen.

7 Anhang

7.1 Veröffentlichungen

- Amphiregulin and Epiregulin expression predicts for treatment efficacy in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with Cetuximab plus CAPIRI or CAPOX: Analysis of the randomized trial of the German AIO CRC study group: KR 0104
S. Stintzing, A. Jung, C. Kapaun et al.
WCGIC 2011 Barcelona
Annals of Oncology 22: v16-v16. Juni 2011
- Combination of Amphiregulin and Epiregulin expression predicts for treatment efficacy in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with Cetuximab plus CAPIRI or CAPOX
S. Stintzing, A. Jung, C. Kapaun et al.
Onkologie 34: 188-188 Sept 2011
- Ligand expression of the EGFR ligands Amphiregulin, Epiregulin, and amplification of the EGFR gene to predict for treatment efficacy in KRAS wild-type mCRC patients treated with Cetuximab plus CAPIRI and CAPOX: Analysis of the randomized AIO CRC-0104 trial.
S. Stintzing, A. Jung, C. Kapaun et al.
ASCO Annual Meeting 2012
J Clin Oncol 30, 2012 (Abstract Nummer 3519)

Prognostic value of cetuximab-related skin toxicity in metastatic colorectal cancer patients and its correlation with parameters of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway: Results from a randomized trial of the GERMAN AIO CRC Study Group

Sebastian Stintzing¹, Christine Kapaun¹, Rüdiger Paul Laubender², Andreas Jung³, Jens Neumann³, Dominik Paul Modest¹, Clemens Giessen¹, Nicolas Moosmann^{1,4}, Andreas Wollenberg⁵, Thomas Kirchner³ and Volker Heinemann¹

¹Department of Haematology and Oncology, Comprehensive Cancer Center, Klinikum Grosshadern, University of Munich, Munich, Germany

²Institute of Medical Informatics, Biometry, and Epidemiology, University of Munich, Munich, Germany

³Institute of Pathology, University of Munich, Munich, Germany

⁴Department of Haematology and Oncology, Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg, Germany

⁵Department of Dermatology and Allergology, University of Munich, Munich, Germany

Skin toxicity is a frequent adverse event of epidermal growth factor receptor (EGFR) targeting agents. Occurrence of cetuximab-induced skin toxicity (Cet-ST) correlates with better treatment response and longer survival times. Molecular markers predicting Cet-ST are still missing. This investigation analyzed the value of Cet-ST for treatment efficacy in a randomized trial comparing cetuximab plus capecitabine/irinotecan to cetuximab plus capecitabine/oxaliplatin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. Patient characteristics and molecular parameters (*KRAS* mutation, EGFR-FISH, EGFR-IHC and EGFR intron-1 polymorphism) of the tumour were correlated with response and Cet-ST. Cet-ST grade 0–1 was observed in 31%, grade 2–3 in 69% of patients. Outcome favoured patients with grade 2–3 Cet-ST with regard to overall response rate (62 vs. 41%), PFS (7.8 vs. 5.2 months) and overall survival (OS) (30.3 vs. 18.0 months). First-cycle rash was observed in 66% of patients and corresponded with longer survival (30.7 vs. 20.2 months, $p = 0.007$). Patients without Cet-ST had a poor outcome (PFS, 1.9 months; OS, 11 months). The correlation of Cet-ST with survival was specifically evident in patients with *KRAS* codon-12-mutated tumours assumed to be cetuximab resistant. In multivariate analysis of patient characteristics, male gender and younger age were significantly correlated with Cet-ST. Among molecular parameters, no significant correlation with Cet-ST was found. Cet-ST is an early predictor of treatment efficacy in cetuximab-treated patients. This effect of Cet-ST is independent of the *KRAS* mutation status, suggesting that Cet-ST rather relates to constitutional factors of the patient than alterations of the EGFR pathway in the tumour.

The development of personalized cancer treatment has become a major focus of research. As an important step in this direction, routine *KRAS* codon 12 and codon 13 testing has been introduced as a key element of decision making when epidermal growth factor receptor (EGFR)-directed anti-

bodies are considered for treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). As a result, this has restricted the approval of cetuximab to *KRAS* wild-type tumours. Meanwhile, it has become increasingly clear that *KRAS* mutational status is not the only determinant of cetuximab-related treatment efficacy because even in patients with *KRAS* wild-type tumours response is not achieved in about 40%.^{1,2} Furthermore, there is evidence to suggest that *KRAS* codon-13-mutated tumours might respond to cetuximab therapy.³

To further improve outcome prediction, multiple molecular markers are presently being tested.^{4,5} In addition, clinical factors may also serve as relevant response predictors. Among these are alterations of blood pressure during treatment with bevacizumab⁶ or acneiform skin rash in patients receiving agents directed against the EGFR.^{7–10}

The present investigation was performed in mCRC patients receiving first-line chemotherapy in combination with cetuximab, a monoclonal antibody directed against the EGFR. Treatment was applied within a randomized phase II

Key words: cetuximab, colorectal cancer, skin toxicity, acneiform rash, capecitabine, first-line

Grant sponsor: Merck-Serono, Darmstadt, Germany

DOI: 10.1002/ijc.27654

History: Received 10 Apr 2012; Accepted 24 Apr 2012; Online 30 May 2012

Correspondence to: Sebastian Stintzing, Department of Haematology and Oncology, Comprehensive Cancer Centre, Klinikum Grosshadern, University of Munich, Marchioninistrasse 15, 81377 Munich, Germany, Tel.: +49-0-89-7095-0, Fax: +49-0-89-7095-5256, E-mail: sebastian.stintzing@med.uni-muenchen.de

trial comparing cetuximab plus capecitabine/irinotecan (CAPIRI-C) to cetuximab plus capecitabine/oxaliplatin (CAPOX-C).¹¹ This trial demonstrated comparable antitumour efficacy in both study arms, an effect which was essentially independent of *KRAS* mutation status when codon-12 and -13 mutations were analyzed together.¹¹

The association of treatment efficacy with cetuximab-induced skin toxicity (Cet-ST) has been previously described in several reports.^{1,2,12,13} This investigation aimed to define parameters being predictive for the occurrence of Cet-ST and which might explain its relationship to treatment response. In this context, it should be noted that Cet-ST is presently understood as a treatment-associated side effect resulting from inhibition of the EGFR in the skin. As all patients of our study had been exposed to cetuximab, molecular factors had been investigated and correlated with Cet-ST within the study population to be assessable for efficacy. The question to be answered is how Cet-ST relates to the effect of cetuximab on the tumour. To this end, skin-related adverse events were analyzed and were confronted with the results from molecular analyses including the *KRAS* mutational status, EGFR amplification and EGFR expression of the tumour. To obtain a parameter linking skin toxicity to EGFR expressed in the skin and in the tumour, we also analyzed the EGFR intron-1 CA single sequence repeat polymorphism. A previous report by Graziano et al. had indicated that shorter germline intron-1 CA repeats related to an increased expression of EGFR in tissue and, as a consequence, to a higher degree of skin toxicity induced by anti-EGFR-directed agents.¹⁴

Material and Methods

Patients

In this retrospective analysis, patients of a phase II study of the German "Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie" (AIO) study group were analyzed. Our study consisted of a total of 185 patients from 35 centres in Germany which were randomized centrally into two arms. In both study arms, cetuximab was given at an initial dose of 400 mg/m² as a 120-min infusion, followed by weekly infusions of 250 mg/m² over 60 min. As recently published,¹¹ patients in the CAPIRI-C arm received chemotherapy with CAPIRI, that is oral capecitabine 800 mg/m² twice daily on days 1–14, followed by a 1-week rest period plus irinotecan 200 mg/m² as a 30-min intravenous infusion on day 1. In patients aged >65 years, doses were further reduced by 20%. Patients in the CAPOX-C arm received capecitabine 1,000 mg/m² twice daily on days 1–14, followed by a 1-week rest period plus oxaliplatin 130 mg/m² as a 120-min intravenous infusion on day 1. Treatment cycles were repeated every 3 weeks until disease progression or unacceptable toxicity. Response was evaluated with consistent imaging techniques (MRI or CT-scan) every 6 weeks (two cycles) according to the RECIST 1.0 criteria. Only patients who were on study for more than 6 weeks and therefore had at least one tumour assessment

and accordingly had a chance to develop cetuximab-related skin toxicities were included into this analysis. These patients were defined as assessable for treatment efficacy. Response to treatment was determined as best overall response rate (ORR = CR + PR) and disease control rate (DCR = ORR + SD).

Specimen characteristics

For immunohistochemical and molecular analyses, formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material of 154 (80.2%) patients was available.

Evaluation of skin toxicity

Skin toxicity was evaluated using the NCI-CTCAE (national cancer institute common toxicity criteria of adverse events), version 3.0 at any treatment cycle: grade 1, macular or papular eruption or erythema without associated symptoms; grade 2, macular or papular eruption or erythema with pruritus or other associated symptoms and localized desquamation or other lesion covering <50% of body surface area; grade 3, severe generalized erythroderma or macular, papular or vesicular eruption and desquamation covering ≥50% of body surface area; grade 4, generalized exfoliative, ulcerative or bullous dermatitis.

As previously reported, cetuximab-related skin toxicity was defined as a composite toxicity which was marked by the investigators as cetuximab related, with the exception of hand-foot-syndrome.^{15,16}

We analyzed the time to first occurrence and time of maximum grade skin toxicity by treatment cycle and its predictive value with regard to treatment efficacy. Furthermore, skin toxicity was grouped into clinically non-relevant skin toxicity (grade 0–1) and clinically relevant skin toxicity (grade 2–3). For clinical relevant acneiform exanthema (NCI CTCAE grade 2 and higher), a predefined standard operating procedure was defined within the study protocol. Clinical relevant Cet-ST, therefore, required specific skin treatment or discontinuation of the study medication. Our study was conducted within the years 2004–2006 where no prophylactic skin therapy was recommended or administered.

Assay methods

All laboratory work was done blinded to the examined endpoint "grade of Cet-ST" as all FFPE samples were numbered according to their clinical research form number.

Immunohistochemistry. EGFR-IHC was done using a monoclonal mouse anti-EGFR antibody (clone 5B7, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). The staining was performed on a Ventana Benchmark XT autostainer using the XT UltraView diaminobenzidine kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). All samples were evaluated by a single pathologist (J.N.). When no staining or only cytoplasmic staining was present, the immunostaining was scored as negative (0). Positive samples were classified into three categories of membranous staining: 1, mild staining; 2, moderate staining; 3, strong

staining. Intensities 0 and 1 were reported as negative. Intensities 2 and 3 were reported as positive.

FISH analyses. FISH analysis was performed according to the method described by Cappuzzo *et al.*¹⁷ An EGFR/CEN7 dual colour probe (Zytomed, Berlin, Germany) was applied following the manufacturer's instructions. Chromatin was counterstained with DAPI, and specimens were evaluated using an epifluorescence microscope (Axioscope 20 Zeiss, Oberkochen, Germany). The result of EGFR FISH was given as median number of signals per nucleus in ten cells for ten tumour foci (a total of 100 cells).

DNA extraction and PCR analyses. DNA extraction from FFPE tissue was done using QIAmp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction. KRAS mutational analysis was performed in a German reference laboratory for KRAS analysis (Institute of Pathology University of Munich) as described earlier.^{11,18} KRAS codon 12 and codon 13 mutations were tested according to the ESMO, ASCO and DGHO (German Association of Haematology and Oncology) guidelines. The number of single sequence CA repeats in intron-1 of the EGFR was determined by PCR in all specimens. Double-strand sequencing was carried out using the following primers: forward 5'-GCT GTT TGA AGA ATT TGA GCC AAC AC-3' and reverse 5'-TCT CTT GAA CCA GGG ACA GCA ATT-3' (biomers.net Ulm, Germany). For length measurement, a fragment length analysis was done using a genetic analyzer (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Homozygous specimens were selected for direct sequencing to verify CA-repeat number. As reported previously,¹⁴ patients were grouped according to the number of CA repeats on both alleles, using a cut-off value of 16 repeats. Short alleles (s) were defined by ≤ 16 repeats and long alleles (l) by a CA repeat of >16 repeats.

Statistical analysis methods

The primary aim was to evaluate Cet-ST as a predictor for ORR and DCR. Therefore, differences in response between the groups were evaluated by Fisher's exact or χ^2 -square test. Secondary endpoints were PFS and overall survival (OS). Differences in survival were analyzed using the Kaplan-Meier estimator and the log-rank test. To compare the impact of different factors on PFS and OS, a Cox proportional hazard regression analysis was performed.

In a second step, possible molecular markers (EGFR-FISH, EGFR-IHC and EGFR intron-1 polymorphism) were correlated with Cet-ST using Fisher's exact test. Cut-off analysis for EGFR-FISH and Cet-ST grade 2–3 was done by receiver operating characteristic (ROC) analysis using EGFR-FISH gene copy number as continuous variables.¹⁹ Cut-off level was determined by the maximal sum of specificity and sensitivity. Logistic regression models were fitted to model the impact of potential variables on skin toxicity. For the selection of variables, a backward elimination relying on

Akaike's Information Criteria (AIC) was performed with the possible variables: age, gender, treatment arm, KRAS mutation and BRAF mutation.

All statistical tests were two-sided and a p -value of <0.05 was considered as statistically significant. R (version 2.11.1) and SPSS PASW 18.0 (SPSS, Chicago, IL) software were used for all statistical analyses.

Results

In the AIO KRK-0104 trial, 149 out of 185 randomized patients received chemotherapy until the first tumour assessment and were defined as the efficacy-assessable population. Patient's characteristics were balanced between treatment arms with regard to median age, sex, Karnofsky performance status, visceral metastasis and number of metastatic sites.¹¹ Further analysis showed no significant difference in efficacy between the KRAS wild type and mutated subgroup. In the CAPIRI arm, ORR was 50% in the wild-type population and 48.5% in the KRAS mutant group. Within the CAPOX arm, ORR was 44.9% in the wild type and 50% in the mutant group.¹¹ Comparably, KRAS mutation status was not associated with significant differences regarding the duration of PFS or OS in the respective treatment arms. As published elsewhere,²⁰ in the CAPIRI arm, PFS was 6.3 months for patients with KRAS wild-type tumours vs. 5.8 months for patients with KRAS mutant tumours. OS times in the CAPIRI arm reach 21.1 months for KRAS wild type and 17.9 months for patients with KRAS mutant tumours. In the CAPOX arm, PFS was 7.1 months for patients with KRAS wild-type tumours and 6.5 months for patients bearing a KRAS mutant tumour. Respective OS times were 23.5 months for the KRAS wild-type cohort and 18.8 months for the patients with KRAS mutant tumours.

Incidence and distribution of Cet-ST

Any grade of Cet-ST was observed in 95% (142/149) of all patients. It predominantly occurred as acneiform rash (88%), but nail changes and other adverse events such as allergic exanthema or dry skin were also noted. Grade 0–1 Cet-ST was observed in 31% (46/149); grade 2–3 Cet-ST in 69% (103/149) of patients. No grade 4 skin toxicity was documented. The percentage of grade 2–3 Cet-ST was comparable between the CAPIRI-C- and the CAPOX-C treatment arms (63 vs. 76%, $p = 0.110$) (Table 1). There was no difference in frequency of Cet-ST between patients with KRAS-mutated tumours and KRAS wild-type tumours.

Kinetics of skin toxicity

In 66% of patients, Cet-ST occurred during the first cycle of treatment. Maximal Cet-ST was reached about one cycle after the first occurrence of Cet-ST. Median time to maximal Cet-ST was two treatment cycles. Accordingly, almost 90% of all Cet-ST were documented during the first two cycles (Table 1). No difference between both treatment arms pertaining to Cet-ST could be observed.

Table 1. Cetuximab-specific skin toxicity: distribution and occurrence¹

	CAPIRI cetuximab		CAPOX cetuximab		Both arms	
	<i>n</i> = 78	%	<i>n</i> = 71	%	<i>n</i> = 149	%
NCI-CTC Grade 0	3	4	4	6	7	5
NCI-CTC Grade 1	26	33	13	18	39	26
NCI-CTC Grade 2	38	49	33	47	71	48
NCI-CTC Grade 3	11	14	21	30	32	22
Occurrence during first cycle	45	61	48	72	93	66
Occurrence until end of 2nd cycle	65	88	61	91	126	89
Median time to occurrence						
Cycle	1		1		1	
Days	21		21		21	
Mean time of occurrence						
Cycle	1.6		1.4		1.5	
Days	32		28		30	
Median time of occurrence of maximum NCI-CTC grade						
Cycle	2		2		2	
Days	42		42		42	
Mean time of occurrence of maximum NCI-CTC grade						
Cycle	2.8		3.1		3.0	
Days	57		61		59	

¹CAPOX: capecitabine, oxaliplatin; CAPIRI: capecitabine, irinotecan; NCI-CTC: National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria.

Predictive value of Cet-ST for response

When all patients were analyzed, Cet-ST grade 2–3 was associated with a significantly higher response to treatment than Cet-ST grade 0–1 with regard to ORR (62 vs. 41%, $p = 0.021$) and DCR (94 vs. 80%, $p = 0.016$) (Table 2a). This effect was not only seen in patients with *KRAS* wild-type tumours (ORR, 63 vs 48%), but also in the group of *KRAS*-mutated patients (ORR, 63 vs 33%) (Tables 2b and 2c). Analyzing only the *KRAS* codon-12-mutated subgroup, ORR (28 vs. 58%; $p = 0.151$) and DCR (82 vs. 100%; $p = 0.083$) were remarkably higher in patients with Cet-ST grade 2–3 (Table 2d).

The distribution of ORR, DCR and PD was dependent on Cet-ST. Patient with no Cet-ST had a DCR of 43%, whereas patients with grade 2 or grade 3 Cet-ST displayed DCRs of 93 and 97%.

Predictive value of Cet-ST for survival

In the whole study population, survival times were longer in patients with Cet-ST grade 2–3 compared to Cet-ST grade 0–1. This was true for PFS (7.8 vs. 5.2 months) and OS (30.3 vs. 18.0 months) as a strong trend, but did not reach the level of statistical significance (Fig. 1a). Comparing patients with any grade of Cet-ST ($n = 142$) to patients with grade 0 Cet-ST ($n = 7$), the difference in PFS (1.9 vs. 7.0 months, p

$= 0.015$) and OS (11.0 vs. 28.7 months, $p = 0.046$) was significant.

The *KRAS* mutation status was assessable in 125 patients (84%) of the assessable for efficacy population. As shown before, taken codon-12 and 13 mutations together, *KRAS* mutational status did not significantly affect treatment efficacy,¹¹ but patients bearing a *KRAS* mutated tumour had a trend towards shorter survival times than *KRAS* wild-type patients.¹¹ Again, it was demonstrated that within the *KRAS*-mutated subgroup patients showing a grade 2–3 Cet-ST had a markedly longer PFS (8.5 vs. 4.8 months) and OS (28.7 vs. 12.4 months) than patients with grade 0–1 Cet-ST. This again did not reach the level of significance (Fig. 1c). Analyzing the group of codon-12-mutated patients ($n = 37$), as a group probably least responding to cetuximab,³ patients with Cet-ST grade 2–3 had a significantly longer PFS (7.5 vs. 4.5 months, $p < 0.001$) and OS (29.2 vs. 11.4 months, $p = 0.001$) than patients without clinically significant Cet-ST (grade 0–1) (Fig. 1d).

To assess the effect of baseline characteristics, clinical observations (Cet-ST) and molecular factors on survival times (PFS and OS) hazard ratios were estimated indicating that EGFR-IHC, EGFR-FISH and EGFR intron-1 polymorphism did not correlate with PFS or OS times (Fig. 2).

Predictive value of first cycle rash

Evaluating the kinetics of Cet-ST, occurrence during the first cycle (first cycle Cet-ST) (21 days) was associated with a significantly longer overall survival [30.7 vs. 20.2 months, $p = 0.007$, hazard ratio (HR) = 0.59] (Fig. 2) in the whole study population. Looking at the subgroups, this effect was limited to patients bearing a *KRAS* codon-12-mutated tumour (OS: 29.2 vs. 15.2 months, $p = 0.024$, HR = 0.43) (Fig. 2). By contrast, neither ORR (57 vs. 54%) nor PFS (7.7 vs. 5.9 months, $p = 0.273$) was significantly influenced by first-cycle Cet-ST (Fig. 2).

Correlation of EGFR-IHC and Cet-ST

EGFR-IHC was assessable in 80% (119/149) of patients. Specimens were reported to be negative for EGFR in 45% (53/119), and positive in 56% (66/119) of specimens. No correlation could be established, neither for the occurrence of Cet-ST (Table 3) nor for the prediction of survival (Fig. 2).

Correlation of EGFR-FISH and Cet-ST

The EGFR-FISH assay was performed in 98 specimens (66%). In 51 specimens, EGFR-FISH evaluation was not possible due to missing tumour material ($n = 27$), or because probes did not stain due to different fixation procedures ($n = 24$). The median number of EGFR signals per cell was 3.36 [95% confidence interval (CI): 2.13–6.31], mean was 3.63 (standard deviation [SD]: 1.18). Using ROC analysis, the cut-off for Cet-ST grade 2–3 was 3.82 signals per nucleus (area under the curve 0.474, sensitivity 65% and specificity 39%). There was no correlation between EGFR-FISH analyses

Table 2. Evaluation of response¹

a) Cetuximab-related skin toxicities assessable to efficacy population (<i>n</i> = 149)	Cet-ST grade 0–1 <i>n</i> = 46 (31%)		Cet-ST grade 2–3 <i>n</i> = 103 (69 %)		<i>p</i> ²
	No.	%	No.	%	
ORR	19	41	64	62	0.021 ³
DCR	37	80	97	94	0.016 ³
PD	9	20	6	6	0.016 ³
b) Cetuximab-related skin toxicities in patients with KRAS wild-type tumours (<i>n</i> = 74)	Cet-ST grade 0–1 <i>n</i> = 25 (34%)		Cet-ST grade 2–3 <i>n</i> = 49 (66%)		<i>p</i> ²
	No.	%	No.	%	
ORR	12	48	31	63	0.225
DCR	21	84	45	92	0.431
PD	4	16	4	8	0.431
c) Cetuximab-related skin toxicities in patients with KRAS-mutated tumours (<i>n</i> = 50)	Cet-ST grade 0–1 <i>n</i> = 15 (30%)		Cet-ST grade 2–3 <i>n</i> = 35 (70%)		<i>p</i> ²
	No.	%	No.	%	
ORR	5	33	22	63	0.070
DCR	12	80	35	100	0.023 ³
PD	3	20%	0	0%	0.023**
d) Cetuximab-related skin toxicities in patients with KRAS codon 12-mutated tumours (<i>n</i> = 37)	Cet-ST grade 0–1 <i>n</i> = 11 (30%)		Cet-ST grade 2–3 <i>n</i> = 26 (70%)		<i>p</i> ²
	No.	%	No.	%	
ORR	3	27	15	58	0.151
DCR	9	82	26	100	0.083
PD	2	18	0	0	0.083

¹PD: progressive disease, ORR: overall response rate (sum of partial and complete response rate); DCR: disease control rate (sum of ORR and stable disease); Cet-ST: cetuximab-related skin toxicity NCI-CTC grade. ²*p* = Fisher's exact test (two sided). ³Significant.

and occurrence of Cet-ST (Table 3) or for the prediction of survival (Fig. 2).

Correlation of EGFR intron-1 polymorphism and Cet-ST

The number of single sequence CA-repeats in intron-1 of the EGFR was determined in 118 specimens (79.2%) and ranged between 15 and 22. Using 16 repeats as cut-off, the following genotypes could be detected: s/s 51 patients, s/l 45 patients and l/l 22 patients. Using these three categories, we were not able to detect any difference in occurrence of skin toxicity (Table 3).

Furthermore, we correlated the number of CA repeats using a cut-off of 35 CA repeats with survival (Fig. 2) but no predictive value could be established.

Multivariate analysis

When multivariate regression analyses were carried out, younger age (*p* = 0.03) and male gender (*p* = 0.01) remained to be associated with Cet-ST grade 2–3 (Fig. 3). Chemotherapeutic backbone (irinotecan vs. oxaliplatin), KRAS or BRAF mutational status showed a possible association according to AIC, but remained statistically non-significant.

Discussion

The present study was performed in patients receiving cetuximab plus CAPIRI vs. cetuximab plus CAPOX in a randomized phase II trial. As both treatment arms induced comparable antitumour activity, they were analysed together. KRAS mutational status was not identified as a statistically significant predictor of ORR, PFS or OS.^{11,21} Other groups investigating cetuximab in combination with capecitabine- or bolus-5-fluorouracil-based regimens reported similar results, implicating that KRAS mutational status might not be the main or the only factor predicting treatment efficacy of EGFR-targeting therapies.^{7,15,22,23} This led to the discussion about the negative predictive value of the different KRAS mutations. Although several retrospective analyses suggest that KRAS p.G13D mutation may respond a cetuximab-based therapy, the actual numbers of evaluable patients are too small to obtain reliable results.^{3,21,24} Furthermore, it has become clear that in tumours with a KRAS codon 12 mutation cetuximab do not have antitumoral activity.

The present investigation was focussed on Cet-ST with regard to its prognostic and predictive relevance. In this context, it needs to be pointed out that both study agents, cetuximab and

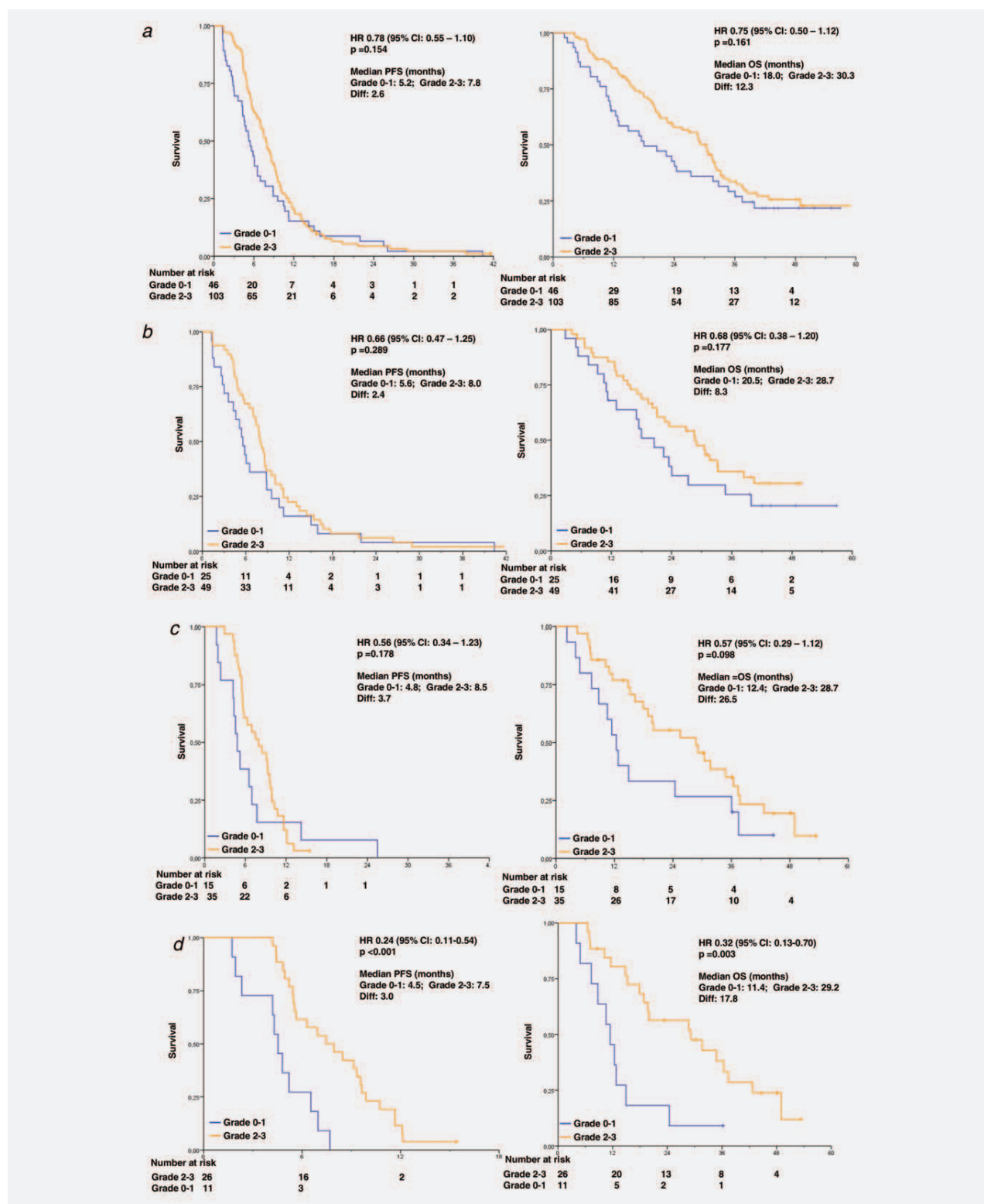


Figure 1. Kaplan-Meier plots of cetuximab-related skin toxicity. (a) Assessable to efficacy population ($n = 149$) PFS and OS Cet-ST grade 0–1 vs. grade 2–3. (b) KRAS wild-type ($n = 74$) PFS and OS Cet-ST grade 0–1 vs. grade 2–3. (c) KRAS-mutated ($n = 50$) PFS and OS Cet-ST grade 0–1 vs. grade 2–3. (d) KRAS 12-mutated ($n = 37$) PFS and OS Cet-ST grade 0–1 vs. grade 2–3.

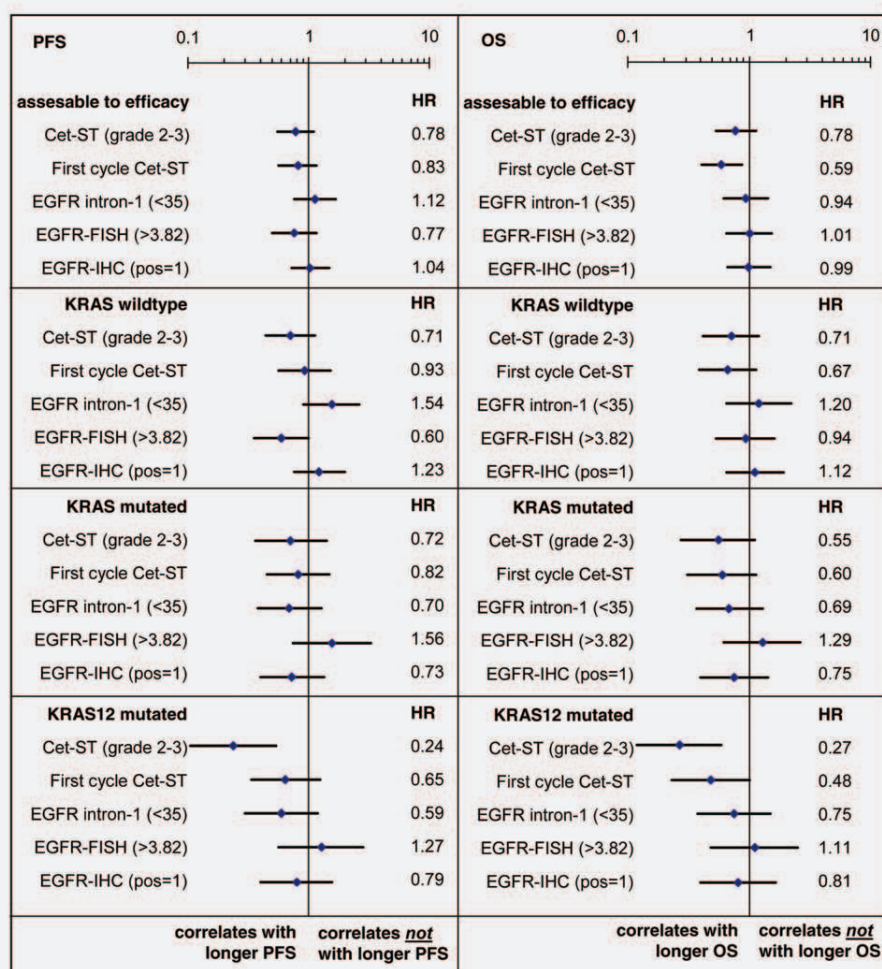


Figure 2. Hazard ratios for survival (PFS and OS). HR, hazard ratio; Cet-ST (grade 2–3), cetuximab-related skin toxicity NCI-CTC grade 2–3; first-cycle Cet-ST, occurrence of Cet-ST during the first cycle of cetuximab; EGFR intron-1, CA single sequence repeat in intron-1 of EGFR; EGFR-FISH, EGFR-fluorescent *in situ* hybridization; EGFR-IHC pos=1 = EGFR immunohistochemistry; 1 is set for positive staining, KRAS 12 mutated, KRAS codon 12 mutated; PFS, progression free survival; OS, overall survival.

capecitabine, may cause skin toxicity. Although they mostly present with a different phenotype (acneiform rash vs. hand-foot syndrome), there is also some possibility of overlap in skin toxicity. Within the present analysis, frequency and grading of Cet-ST were within the range of previously published data.^{1,2,15,16} Accordingly, there is no clear indication of any overlapping effects of skin toxicity between capecitabine and cetuximab.

Cet-ST is an early event in the treatment with cetuximab as it occurred during the first 21 days of treatment in 66% of patients, and in more than 90% within the first 42 days. This is in line with the previously published data.^{13,25} The velocity of its occurrence appears to be related to outcome parameters, too. In fact, first-cycle Cet-ST observed during the initial 21 days of treatment was associated with prolonged OS (30.7 vs. 20.2 months, $p = 0.007$), whereas it had no significant impact on ORR or PFS.

Several reports investigating both, cetuximab mono- and combination therapies, have indicated a correlation between the degree of skin toxicity and the treatment efficacy.^{12,13,26,27} Also in the present study, grade 2–3 Cet-ST was associated with a superior outcome compared grade 0–1 Cet-ST. It is notable that this effect was observed as well in patients with KRAS wild-type and mutant tumours. The present analysis, therefore, demonstrates that grade 2–3 Cet-ST clearly remained a strong indicator of a more favourable outcome with regard to ORR, DCR, PFS and OS.

It is important to note that patients without any Cet-ST are characterised by a very poor outcome. In the present study, this unfavourable patient group had a PFS of 1.9 months and an OS of 11 months. Data from the CRYSTAL trial support this observation as the median PFS of patients without acneiform exanthema was 5.4 months compared to 9.4 months in patients with grade-2 and 11.3 months in

Table 3. Correlation of Cet-ST with EGFR-IHC, EGFR-FISH and EGFR intron-1 CA repeat¹

	<i>n</i>	Grade 0 <i>n</i> = 7	Grade 1–3 <i>n</i> = 142	<i>p</i>	Grade 0–1 <i>n</i> = 46	Grade 2–3 <i>n</i> = 103	<i>p</i>
EGFR-IHC							
Negative	53	2 (29%)	51 (46%)		20 (51%)	33 (41%)	
Positive	66	5 (71%)	61 (54%)	0.46 ²	19 (49%)	47 (59%)	0.33 ²
EGFR-FISH							
≤3.09 copies	35	2 (33%)	33 (36%)		13 (39%)	22 (34%)	
>3.09 copies	63	4 (67%)	59 (64%)	>0.99 ²	20 (61%)	43 (66%)	0.66 ²
EGFR intron-1 polymorphism							
s/s	51	2 (33%)	49 (44%)		22 (58%)	29 (36%)	
s/l	45	3 (50%)	42 (38%)	0.83 ³	12 (32%)	33 (41%)	0.07 ³
l/l	22	1 (17%)	21 (19%)		4 (11%)	18 (23%)	

¹Abbreviations: grade: cetuximab-related skin toxicity (NCI-CTC grade), EGFR-IHC: EGFR immunohistochemistry; EGFR-FISH: EGFR fluorescens *in situ* hybridisation (cut-off 3.09 copies per cell); EGFR intron-1 CA-single sequence repeat (s = ≤16; l = >16). ²Fisher's exact test (two sided). ³χ²-square test.

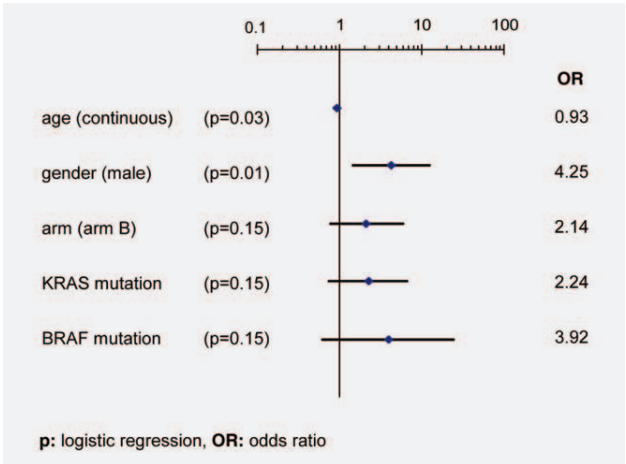


Figure 3. Odds ratios of possible predictors of Cet-ST (grade 2–3).
p: logistic regression, OR: odds ratio.

patients with grade-3 skin toxicity.²⁸ Jonker and colleagues testing cetuximab monotherapy against best supportive care (BSC) in heavily pre-treated patients were able to show that patients with grade 0 skin toxicity in the cetuximab arm had an OS of 2.6 months which was even worse than the median of 4.6 months of the BSC group²⁵ This indicates that patients not developing Cet-ST under a cetuximab-based therapy have a specifically poor prognosis and might better be scheduled towards alternative therapeutic strategies.

It was primarily unexpected and of great interest to find that also in the group of patients with *KRAS* mutant tumours, Cet-ST was revealed as an indicator of prolonged survival (Fig. 1c). A comparable observation was also reported from the PRIME study investigating the combination of panitumumab and FOLF-FOX4.²⁹ In that trial, patients with *KRAS*-mutated tumours who developed skin toxicity grade 2–4 had a longer PFS (8.8 vs. 7.3 months) and OS (19.3 vs. 15.5 months) than patients who presented with grade 0–1 toxicity.²⁹ Similar results have been reported by Price et al. who investigated the combination of panitumumab, irinotecan and infusional 5-FU.³⁰

According to the present assumptions, *KRAS*-mutated tumours should not respond to anti-EGFR directed antibodies.^{31,32} Therefore, it is unclear how Cet-ST can correlate with ORR and survival even in patients bearing *KRAS*-mutated tumours. When we tested *KRAS* codon-12-mutated patients, a group most likely not responding to cetuximab,^{3,21} the development of Cet-ST grade 2–3 became highly significant for PFS ($p < 0.001$, HR = 0.24) and OS ($p = 0.003$; HR = 0.31). The same effect could be observed for first-cycle Cet-ST. A possible explanation might be that in tumours responding to cetuximab plus chemotherapy (*KRAS* wild type) the prognostic value of Cet-ST is only a minor determinant of survival. However, in patients not responding to cetuximab (*KRAS* codon-12-mutated tumours) the prognostic impact of skin toxicity is unveiled.

It is not possible to investigate Cet-ST without the application of cetuximab. The investigation of tumours most likely not responding to cetuximab, as it may be found in *KRAS* codon-12-mutated tumours, might therefore be the closest approximation to separate the predictive and the prognostic value of Cet-ST. Accordingly, the present findings lead to the hypothesis that Cet-ST separates patients with different tumour- or host-related characteristics which ultimately result in different prognostic subgroups, and skin toxicity rather characterizes the patient than the biology of the tumour. Occurrence of Cet-ST may be an indicator of a cetuximab-triggered immune response. Patients not showing this response may have poorer outcome caused by a suppressed or low immune system. The immune response on the effect of chemotherapy is currently under discussion. Number and distribution of T cells within the tumour margin^{33,34} are known prognostic factors of survival in metastatic colorectal cancer. However, those findings have not been correlated to specific drugs or antibodies, used in metastatic colorectal cancer,³⁵ yet.

When Cet-ST is accepted as a predictor of outcome, the question arises if Cet-ST itself can be predicted by a molecular marker. There have been several efforts to predict Cet-ST.^{14,36–38} Among the possible candidates are EGFR gene

expression or amplification, EGFR protein expression, EGFR intron-1 single CA repeat polymorphism³⁹ or other polymorphisms inside the EGFR gene.^{37,39} The value of EGFR intron-1 polymorphism to predict Cet-ST is currently under discussion. Graziano *et al.* were able to identify the s/s (short/short) genotype, using a cut-off of 16 CA repeats, as a predictive factor for the development of Cet-ST.¹⁴ Other groups were not able to confirm this data.^{36–38} Comparably, EGFR intron-1 polymorphism was also not identified as a predictor of Cet-ST or outcome in patients receiving oral tyrosine kinase inhibitors such as erlotinib or gefitinib.^{40,41} Reasons for this ambiguity may be the discordance of EGFR intron-1 repeat number between primary tumour and metastases³⁶ or the varying cut-off definitions.³⁸ Therefore, our data are the contribution to the actual discussion.

Looking at skin toxicity as a class effect of all EGFR-targeting agents, male gender and younger age have also been identified as predictors of skin toxicity in the study of Moore *et al.* treating pancreatic cancer with erlotinib plus gemcitabine.⁸

In conclusion, Cet-ST occurs early in the course of treatment and is a potent indicator of favourable outcome. Patients without any skin toxicity have a very poor prognosis and should early on be directed to alternative treatment approaches. The correlation of Cet-ST with outcome parameters is observed in patients with *KRAS* wild-type and mutant tumours. The most relevant correlation of Cet-ST in accordance to PFS and OS was seen in patients bearing a *KRAS* codon-12-mutated tumour. As this subgroup is expected to have the lowest probability to respond to cetuximab, we conclude that Cet-ST is of prognostic rather than that of predictive value and might be an indicator of parameters such as a more responsive immune system.

Acknowledgements

The authors thank all patients who consented to enter the study and all investigators from the participating study sites for their great support. The authors also thank Matthias Wolff for expert secretarial help and the contract research organization ClinAssess® GmbH (Leverkusen, Germany) for data collection.

References

1. Van Cutsem E, Kohn CH, Hitre E, *et al.* Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360:1408–17.
2. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, *et al.* Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:663–71.
3. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, *et al.* Association of *KRAS* p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Am Med Assoc* 2010;304:1812–20.
4. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, *et al.* Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3230–7.
5. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, *et al.* *KRAS* codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in *KRAS* codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;101:715–21.
6. Scartozzi M, Galizia E, Chiorrini S, *et al.* Arterial hypertension correlates with clinical outcome in colorectal cancer patients treated with first-line bevacizumab. *Ann Oncol* 2009;20:227–30.
7. Gatzemeier U, von Pawel J, Vynnychenko I, *et al.* First-cycle rash and survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer receiving cetuximab in combination with first-line chemotherapy: a subgroup analysis of data from the FLEX phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011;12:30–7.
8. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, *et al.* Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007;25:1960–6.
9. Wacker B, Nagrani T, Weinberg J, *et al.* Correlation between development of rash and efficacy in patients treated with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in two large phase III studies. *Clin Cancer Res* 2007;13:3913–21.
10. Potthoff K, Hofheinz R, Hassel JC, *et al.* Interdisciplinary management of EGFR-inhibitor-induced skin reactions: a German expert opinion. *Ann Oncol* 2011;22:524–35.
11. Moosmann N, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, *et al.* Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: AIO KRK-0104—a randomized trial of the German AIO CRC Study Group. *J Clin Oncol* 2011;29:1050–8.
12. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337–45.
13. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, *et al.* Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006;24:4914–21.
14. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, *et al.* Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1427–34.
15. Ocvirk J, Brodowicz T, Wrba F, *et al.* Cetuximab plus FOLFOX6 or FOLFIRI in metastatic colorectal cancer: CECOG trial. *World J Gastroenterol* 2010;16:3133–43.
16. Tol J, Koopman M, Cats A, *et al.* Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360:563–72.
17. Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, *et al.* EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2008;19:717–23.
18. Neumann J, Zeindl-Eberhart E, Kirchner T, *et al.* Frequency and type of *KRAS* mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2009;205:858–62.
19. Selzman CH, Meldrum DR, Cain BS, *et al.* Interleukin-10 inhibits postinjury tumor necrosis factor-mediated human vascular smooth muscle proliferation. *J Surg Res* 1998;80:352–56.
20. Moosmann N, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, *et al.* Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: AIO KRK-0104—a randomized trial of the German AIO CRC study group. *J Clin Oncol* 2011;29:1050–8.
21. Modest DP, Jung A, Moosmann N, *et al.* The influence of *KRAS*- and BRAF-mutations on the efficacy of cetuximab-based 1st-line therapy of metastatic colorectal cancer: an analysis of the AIO KRK-0104-trial. *Int J Cancer* 2011. doi: 10.1002/ijc.26467. [Epub ahead of print].
22. Tveit K, Guren T, Glimelius B, *et al.* Randomized phase III study of 5-fluorouracil/folinat/oxaliplatin given continuously or intermittently with or without cetuximab, as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: The NORDIC VII Study (NCT00145314). *Ann Oncol* 2010;21:viii1–viii12, 2010;ESMO 2010 Abstract: LBA20.
23. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, *et al.* Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011;377:2103–14.
24. Tejpar S, Bokemeyer C, Celik I, *et al.* Influence of *KRAS* G13D mutations on outcome in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. 2011 ASCO Annual Meeting. *J Clin Oncol* 2011; 29(suppl; abstr 3511).
25. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, *et al.* K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359:1757–65.
26. Pessino A, Artale S, Sciallero S, *et al.* First-line single-agent cetuximab in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 2008;19:711–6.

27. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004;22:1201–8.
28. Van Cutsem E, Rougier P, Kohne C, et al. A meta-analysis of the CRYSTAL and OPUS studies combining cetuximab with chemotherapy (CT) as 1st-line treatment for patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): results according to KRAS and BRAF mutation status. *EJC Suppl* 2009;7:345–45.
29. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010;28:4697–705.
30. Price TJ, Peeters M, Douillard J, et al. Safety summary of panitumumab (pmab) in combination with chemotherapy (ctx) from four clinical trials in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2009; 27(suppl; abstr e15005).
31. Lievre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374–9.
32. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007;96:1166–9.
33. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011;71:1263–71.
34. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 2011;29:610–8.
35. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:151–60.
36. Park JH, Han SW, Oh DY, et al. Analysis of KRAS, BRAF, PTEN, IGF1R, EGFR intron 1 CA status in both primary tumors and paired metastases in determining benefit from cetuximab therapy in colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;68:1045–55.
37. Klinghammer K, Knodler M, Schmitt A, et al. Association of epidermal growth factor receptor polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res* 2010;16:304–10.
38. Dahan L, Norguet E, Etienne-Grimaldi MC, et al. Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *Biomed Chromatogr Cancer* 2011;11:496.
39. Miligi L, Costantini AS, Benvenuti A, et al. Occupational exposure to solvents and the risk of lymphomas. *Epidemiology* 2006;17:552–61.
40. Boeck S, Jung A, Laubender RP, et al. Molecular markers of the EGFR pathway in erlotinib-treated patients with advanced pancreatic cancer (APC): translational analyses of a randomized, cross-over AIO phase III trial-2011 ASCO Annual Meeting. *J Clin Oncol* 2011;29(suppl; abstr 4047).
41. Parmar S, Schumann C, Rudiger S, et al. Pharmacogenetic predictors for EGFR-inhibitor-associated skin toxicity. *Pharmacogenomics J* 2011. doi: 10.1038/tpj.2011.51. [Epub ahead of print].

7.2 Materialien und Geräte

7.2.1 Allgemein verwendete Geräte

Zentrifuge Centrifuge 5424	Bestellnr. 5424.000.014	Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Micro-Zentrifuge	Bestellnr. 3-1820	neoLab Migge Laborbedarf Rischerstr. 7-9, 69123 Heidelberg
Thermomixer comfort 2ml	Bestellnr. 5355.000.011	Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
Vortex Genie 2	Cat.Nr. SI-0236	Scientific Industries, 70 Orville Drive, Bohemie, New York 11716
Pipetten, verschiedene Volumina	Bestellnr. 4910.000.018-093	Eppendorf, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg

Tab. 7.1: Übersicht über allgemein verwendete Geräte

7.2.2 Expressionsbestimmung der EGFR-Liganden

mRNS-Isolation und cDNS-Herstellung

RNeasy FFPE Kit	Cat.Nr. 73504	QIAGEN GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden
QiaCube Vollautomat für DNA-, RNA- und Proteinaufreinigung	Cat.Nr. 9001293	siehe oben
Filtertips 1000µl für QiaCube	Cat.Nr. 995652	siehe oben
Rotor Adapter	Cat.Nr. 990394	siehe oben
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Cat. No. 205311	siehe oben

Tab. 7.2: Übersicht über die verwendeten Materialien bei der cDNS-Herstellung

Real-Time PCR: Verwendete Primer

AREG Primer (u)	cggagaatgcaaatatagagcac	biomers.net GmbH, Söflinger Str. 100 89077 Ulm
AREG Primer (l)	caccgaaatattcttgctgaca	siehe oben
EREG Primer (u)	tggtctcttcactcaggtctca	siehe oben
EREG Primer (l)	cgtgagttggcatagggAAC	siehe oben
β -Actin Primer (u)	ccaaccgcgagaagatga	siehe oben
β -Actin Primer (l)	ccagaggcgtacaggatag	siehe oben
GAPDH Primer (u)	agccacatcgctcagacac	siehe oben
GAPDH Primer (l)	gcccaatacgaccaaattcc	siehe oben

Tab. 7.3: Übersicht über die verwendeten Primer bei der Real-Time PCR; u=upper, l=lower

Real-Time PCR: Reagenzien und PCR-Gerät

LightCycler 480 Probes Master	Cat.Nr. 04707494001	Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Cat.Nr. 04729692001	siehe oben
LightCycler 480 Real-Time PCR Instrument		siehe oben

Tab. 7.4: Übersicht über die verwendeten Materialien bei der Real-Time PCR**Verwendete UPL**

Universal Probe Library Probe #3 (EpCAM)	Cat.Nr. 04685008001	Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
Universal Probe Library Probe #38 (AREG)	Cat.Nr. 04687965001	siehe oben
Universal Probe Library Probe #60 (GAPDH)	Cat.Nr. 04688589001	siehe oben
Universal Probe Library Probe #64 (β -Actin)	Cat.Nr. 04688635001	siehe oben
Universal Probe Library Probe #86 (EREG)	Cat.Nr. 04689119001	siehe oben

Tab. 7.5: Übersicht über die verwendeten UPL bei der Real-Time PCR**7.2.3 FISH****Ausführliches Protokoll**

- Entparaffinieren mit Xylol 3x10 Min.
- Reinigen mit Ethanol (100%) 3x10 Min.
- Vorbehandlung: 210 μ l heiße Natriumisothiocyanat-Lsg. auf den Schnitt aufbringen,
mit Deckglas abdecken,
bei 80°C für 30 Min. inkubieren

- Spülen in Aqua bidest.
- Protease-Behandlung: 200µl Pepsin-Lsg. auf den Schnitt aufbringen,
mit Deckglas abdecken,
bei 37°C für 30 Min. inkubieren
- Spülen in Aqua bidest.
- Präparate lufttrocknen
- Denaturieren bei 80°C auf der Heizplatte
- EGFR-Sonde auf den Schnitt aufbringen,
mit Deckglas abdecken
- Inkubieren bei 37°C über Nacht
- Waschen in 0,1xSSC bei 42°C für 3x10 Min.
- Inkubieren in BT-Puffer bei 42°C für 5 Min.
- Eindecken mit 25µl DAPI
- Lagerung bis zur Auszählung im Dunkeln bei 4°C

Gruppe	Kriterium	N	%
schwache Polysomie	<10% der Zellenkerne haben ≥ 4 Gensignale	12	10%
mittlere Polysomie	10-40% der Zellkerne haben ≥ 4 Gensignale	49	41%
starke Polysomie	$\geq 40\%$ der Zellkerne haben ≥ 4 Gensignale	59	49%

Tab. 7.6: Übersicht über die Aufteilung der Präparate in die drei Gruppen „schwache Polysomie“, „mittlere Polysomie“ und „starke Polysomie“

Natriumisothiocyanat	1M, 8,1g auf 100ml Aqua bidest.	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt
Pepsinlösung	Pepsin Stock 100mg/ml aus Pepsin crystallin	Sigma-Aldrich Chemie, 82018 Taufkirchen
20xSSC	66g auf 250ml Aqua bidest., pH 5,3	Abbott GmbH & Co KG, 65205 Wiesbaden
0,1xSSC	1ml 20xSSC auf 200ml Aqua bi- dest.	
BT-Puffer	3,1g Natriumhydrogencarbonat 0,05g tri-Natriumcitrat-Dihydrat 250µl Tween 20 (Polysorbat)	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt
DAPI	1,5µl DAPI Stock auf 1ml Vectashield mounting medium	Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Str. 116, 68305 Mannheim
Spec EGFR/CEN7 Dual Color Probe	Art.Nr. Z-2033-200	ZytoVision GmbH, Fischkai 1 27572 Bremerhaven
Fluoreszenzmikroskop	Axioscop 20	Zeiss, Oberkochen
Bedientastatur	MAC 500	LEP Controler Systems, New York
Kamera	AxioCam MRC	Zeiss, Oberkochen

Tab. 7.7: Übersicht über die verwendeten Materialien bei der FISH-Analyse

7.2.4 Längenbestimmung des Intron 1-Polymorphismus

Ausführliches Protokoll

- Entparaffinieren mit Xylol 2x15 Min.
- Reinigen mit Ethanol (100%) 3x10 Min.
- Vorbereiten des Puffers: 180µl ATL und 20µl Proteinase K
- Auskratzen der Tumorareale unter dem Lichtmikroskop
- Inkubation des Gewebes in Pufferlösung über Nacht bei 55°C
- DNA-Isolation mit Hilfe des QiaCube nach Anleitung des Herstellers

DNS-Isolation

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Cat.Nr. 56404	QIAGEN GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden
QiaCube Vollautomat für DNA-, RNA- und Proteinaufreinigung	Cat.Nr. 9001293	siehe oben
Filtertips 1000 μ l für QiaCube	Cat.Nr. 995652	siehe oben
Rotoradapter	Cat.Nr. 990394	siehe oben

Tab. 7.8: Übersicht über die verwendeten Materialien bei der DNS-Isolation**DNS-Amplifikation in der PCR**

HotStarTaq DNA Polymerase	Cat.Nr. 203205	QIAGEN GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden
DNA Polymerization Mix dNTP Set	Cat.Nr. 28-4065-57	GE Healthcare GmbH, Oskar-Schlemmer Str. 11 80807 München
Human Genomic DNA male	Cat.Nr. G1471	PROMEGA, 68298 Mannheim
EGFR Intron 1 Primer (u)	5'-gctgtttgaacaacc-3' (u)	biomers.net GmbH, Söflinger Str. 100 89077 Ulm
EGFR Intron 1 Primer (l)	5'-tctcttgaacagcaat-3' (l)	siehe oben

Tab. 7.9: Übersicht über die verwendeten Reagenzien bei der EGFR Intron 1-PCR

Für alle Proben, deren DNS vermehrt werden soll, wird ein gemeinsamer Mastermix angesetzt. Das heißt, dass alle Reagenzvolumina mit der Anzahl der Proben multipliziert werden. Tabelle 7.10 zeigt ein Beispiel für 10 Proben. Zur Sicherheit wird der Mastermix für 3-5 Proben mehr angesetzt. So wird ein möglicher Verlust durch Pipettierungenauigkeiten ausgeglichen. Jeweils 38 μ l des Mastermix werden auf Reagiergefäße verteilt. In jedes

Gefäß werden 2µl der zu vermehrenden DNS pipettiert und die Gefäße in einen Thermocycler überführt. Nach 2-minütiger Denaturierung bei 96°C werden 40 Annealing-Zyklen bei einer Temperatur von 63,4°C durchlaufen.

Intron 1	10 Ansätze			
Reagenz	Ausgangs-Konzentration	End-Konzentration	1facher Ansatz [µl]	Mastermix für 10 Proben [µl]
Wasser			32,6	326
10fach Puffer	10x	1x	4	40
dNTPs	20mM	0,2mM	0,4	4
Primer-Mix	20µM	0,4µM	0,8	8
Taq-Polymerase	5U/µl	1U	0,2	2
DNS			2	
Gesamt-Vol.			40	

Tab. 7.10: PCR-Plan für DNS-Amplifikation des Intron 1 des EGFR-Gens für 10 Proben

Fragmentlängenanalyse

GeneScan 500 LIZ Size Standard	Part Nr. 4322682	Applied Biosystems, Frankfurter Str. 129 B, 64293 Darmstadt
Hi-Di Formamide	Part Nr. 4311320	siehe oben
ABI Prism 3130 Genetic Analyzer	Part Nr. 3130-01	siehe oben

Tab. 7.11: Übersicht über die verwendeten Materialien bei der Fragmentlängenanalyse

Sequenzierung

pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems	Cat.Nr. A3600	PROMEGA Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Cat.Nr. 4337449	Applied Biosystems, Frankfurter Str. 129 B, 64293 Darmstadt
Primer universal	5'gtaaaacgacggccagt'3	biomers.net GmbH, Söflinger Str. 100 89077 Ulm
Primer reverse	5'caggaaacagctatgac'3	biomers.net GmbH, Söflinger Str. 100 89077 Ulm
Qiagen DyeEx 2.0 spin kits	Cat.Nr. 63204	QIAGEN GmbH, Qiagen Str. 1, 40724 Hilden
GeneScan 500 LIZ Size Standard	Part Nr. 4322682	Applied Biosystems, Frankfurter Str. 129 B, 64293 Darmstadt
Hi-Di Formamide	Part Nr. 4311320	Applied Biosystems, Frankfurter Str. 129 B, 64293 Darmstadt
ABI Prism 3130 Genetic Analyzer	Part Nr. 3130-01	Applied Biosystems, Frankfurter Str. 129 B, 64293 Darmstadt

Tab. 7.12: Übersicht über die verwendeten Materialien bei der Sequenzierung**7.2.5 Immunhistochemie****Ausführliches Protokoll**

- Entparaffinieren mit Xylol und Ethanol (100%)
- Mikrowellenbehandlung: 2x15 Min. bei 750W;
20 Min. bei Raumtemperatur auskühlen
- Spülen mit TRIS-Puffer: 2x5 Min. bei pH 7,5

- Block der endogenen Peroxidase: Spülen mit Wasserstoffperoxid (7,5%) für 10 Min., anschließend Spülen mit Wasser für 10 Min.
- Entparaffinieren mit Xylol und Ethanol (100%)
- Mikrowellenbehandlung: 2x15 Min. bei 750W;
20 Min. bei Raumtemperatur auskühlen
- Spülen mit TRIS-Puffer: 2x5 Min. bei pH 7,5
- Block der endogenen Peroxidase: Spülen mit Wasserstoffperoxid (7,5%) für 10 Min., anschließend Spülen mit Wasser für 10 Min
- Spülen mit TRIS-Puffer: 2x5 Min.
- Inkubation mit Blocking Serum (enthalten im ImmPRESS Reagent-Kit): 20 Min.
- Primärantikörper PTEN 1:40, 60 Min. bei Raumtemperatur
- Spülen mit TRIS-Puffer: 2x5 Min.
- Sekundärantikörper Anti-Mouse IgG: 30 Min.
- Spülen mit TRIS-Puffer: 2x5 Min.
- Chromogen: AEC+ für 10 Min.
- Spülen mit Wasser für 10 Min.
- Gegenfärben mit Hematoxylin
- Spülen mit Wasser für 10 Min.
- Eindecken mit Glycerringelantine



Abb. 7.1: Präparat Nr. 139 in der HE-Färbung und nach PTEN-IHC mit markiertem Tumoreareal

Reagenzien

Objektträger Micro Slides x-tra adhesive Surgipath	Art.Nr. 05505654	LABOnord Lehmkuhlenweg 19 41065 Mönchengladbach
Target Retrieval Solution High pH	Code S3307	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstr. 161, 22769 Hamburg
Monoclonal Mouse Anti-Human PTEN Clone 6H2.1	Code M3627	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstr. 161, 22769 Hamburg
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Code S3022	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstr. 161, 22769 Hamburg
ImmPRESS Reagent Anti-Mouse Ig Peroxidase	Cat.Nr. MP-7402	Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010
AEC+ High Sensitivity Substrate Chromogen	Code K3461	Dako Deutschland GmbH, Stresemannstr. 161, 22769 Hamburg
Hematoxylin Gill's Formula	Cat.Nr. H-3401	Vector Laboratories, Inc. 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010
Kaisers Glyceringelatine	Cat.Nr. 1.09242.0100	Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt

Tab. 7.13: Übersicht über die verwendeten Materialien bei der Immunhistochemie

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Alle im Text verwendeten Abkürzungen sind im Folgenden aufgeführt.

AK	Antikörper
AKT	AKR mouse thymoma-inducing
AREG	Amphiregulin
AUC	Area Under the Curve, Fläche unter der Kurve
bp	Basenpaar
BRAF	RAS Associated Factor B
CAPIRI	Capecitabin plus Irinotecan
CAPOX	Capecitabin plus Oxaliplatin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CI	Konfidenzintervall
CIOX	Capecitabin plus Irinotecan oder Oxaliplatin
CISH	Chromogen in situ-Hybridisierung
Cp	Crossing Point
CR	Complete Remission, komplette Remission
DCR	Disease Controll Rate
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor

EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EpCAM	Epithelial Cellular Adhesion Molecule
EREG	Epiregulin
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
FOLFIRI	Folinsäure plus Fluoruracil + Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure plus Fluoruracil + Oxaliplatin
FUFA	Fluoruracil plus Folinsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCN	Gene Copy Number
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IHC	Immunhistochemie
ITT	Intention To Treat
JNK	Janus Kinase
KOF	Körperoberfläche
KRK	Kolorektales Karzinom
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom

mRNS	messenger RNS
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NSCLC	Non-Small-Cell Lung Cancer, Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
ORR	Overall Response Rate, Gesamtansprechen
ORR-P	Wahrscheinlichkeit für Therapieansprechen
OS	Overall Survival, Gesamtüberleben
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PD	Progressiv Disease, progressive Erkrankung
PFS	Progression Free Survival, progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIP-2	Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat
PIP-3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat
PLC γ	Phospholipase C γ
PR	Partielle Remission
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RNS	Ribonucleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	Stable Disease, stabile Erkrankung
STAT	Signal Transducer und Activator of Transcription

TGF- α transformierender Wachstumsfaktor α

TK Tyrosinkinasen

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

8 Danksagungen

Für die Möglichkeit, die Untersuchungen in den Laboren des Pathologischen Instituts München durchführen zu können danke ich ganz herzlich dem Leiter des Instituts Herrn Professor Dr. med. Thomas Kirchner.

Herrn Professor Dr. biol. Andreas Jung danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Materie und die Laborarbeit und die große Unterstützung bei allen fachlichen Problemen.

Ganz herzlich danke ich Frau Jana Reiche (M.Sc., Pathologisches Institut München) für die Einarbeitung in die Real-Time PCR, die viele Geduld und die gute Freundschaft.

Frau Alexandra Schindler (MTA, Pathologisches Institut München) danke ich von Herzen für die kontinuierliche Hilfe bei allen Problemen, die vielen netten Gespräche und die gute Freundschaft.

Bei den Damen des Diagnostischen Labors bedanke ich mich herzlich für die Geduld bei der Einarbeitung in die FISH und die Möglichkeit die Untersuchungen in ihren Räumlichkeiten durchführen zu dürfen.

Vielen Dank auch den Damen aus der Immunhistologie für die Hilfe bei der Durchführung der IHC.

Herrn Professor Dr. med. Volker Heinemann danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die konstruktive Kritik.

Mein größter Dank gilt PD Dr. med. Sebastian Stintzing für die außergewöhnlich gute Betreuung, die vielen Stunden zusätzlicher Arbeit, die hohe Zuverlässigkeit, die vielen guten Ratschläge, die Motivation und die gute Zusammenarbeit.

Literaturverzeichnis

- [1] Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman D, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26(10):1626–1634, Apr 2008.
- [2] Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusatis G, Lacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res*, 64(24):9139–9143, Dec 2004.
- [3] Auernhammer CJ, Ebert M, Geinitz H, Graeb C, Heinemann V, Hiller E, Hoffmann J, Jung A, Kalusche EM, Keller G, Kolligs FT, Kreis ME, Licht T, Meyer zum Büschenfelde C, Schäfer C, Schlemmer M, Schmid RM, Theisen J. *Manual Gastrointestinale Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Tumorzentrum München, 8. Auflage, 2010.
- [4] Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N Engl J Med*, 351(27):2883, Dec 2004.
- [5] Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*, 67(6):2643–2648, Mar 2007.

- [6] Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27(5):663–671, Feb 2009.
- [7] Cappuzzo F, Finocchiaro G, Rossi E, Jänne PA, Carnaghi C, Calandri C, Bencardino K, Ligorio C, Ciardiello F, Pressiani T, Destro A, Roncalli M, Crino L, Franklin WA, Santoro A, Varella-Garcia M. EGFR FISH assay predicts for response to cetuximab in chemotherapy refractory colorectal cancer patients. *Ann Oncol*, 19(4):717–723, Apr 2008.
- [8] Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 97(9):643–655, May 2005.
- [9] Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*, 23:1803–1810, 2005.
- [10] Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Cartenì G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filippelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C; Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol*, 23(22):4866–4875, Aug 2005.

- [11] Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 351(4):337–345, Jul 2004.
- [12] de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18(16):2938–2947, Aug 2000.
- [13] Di Cristofano A und Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*, 100:387–390, 2000.
- [14] Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, 355(9209):1041–1047, Mar 2000.
- [15] Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, 97(8):1139–1145, Oct 2007.
- [16] Frolov A, Liles JS, Kossenkova AV, Tzeng C-WD, Jhala N, Kulesza P, Varadarajulu S, Eloubeidi M, Heslin MJ, Arnoletti JP. Epidermal growth factor receptor (EGFR) intron 1 polymorphism and clinical outcome in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg*, 200(3):398–405, Sep 2010.
- [17] Goldstein NS und Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer*, 92(5):1331–1346, Sep 2001.

- [18] Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, Canestrani E, Santini D, Catalano V, Bissoni R, Torresi U, Floriani I, Schiavon G, Andreoni F, Maltese P, Rulli E, Humar B, Falcone A, Giustini L, Tonini G, Fontana A, Masi G, Magnani M. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26:1427–1434, 2008.
- [19] Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, Chansky K, Crowley J, Kelly K, Franklin WA, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M, Gandara DR. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol*, 26(20):3351–3357, Jul 2008.
- [20] Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, Maroun J, Walde D, Weaver C, Harrison E, Burger HU, Osterwalder B, Wong AO, Wong R. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 19(8):2282–2292, Apr 2001.
- [21] Huang CL, Yang CH, Yeh KH, Hu FC, Chen KY, Shih JY, Lin ZZ, Yu CJ, Cheng AL, Yang PC. EGFR intron 1 dinucleotide repeat polymorphism is associated with the occurrence of skin rash with gefitinib treatment. *Lung Cancer*, 64(3):346–351, Jun 2009.
- [22] Jacobs B, De Roock W, Piessevaux H, Van Oirbeek R, Biesmans B, De Schutter J, Fieuws S, Vandesompele J, Peeters M, Van Laethem JL, Humblet Y, Pénault-Llorca F, De Hertogh G, Laurent-Puig P, Van Cutsem E, Tejpar S. Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*, 27(30):5068–5074, Oct 2009.
- [23] Jauch KW und Nüssler V. *Tumorzentrum München, Jahrbuch 2011*. Agileum Gesundheitsakademie, 2011.
- [24] Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA

- 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*, 25(22):3230–3237, Aug 2007.
- [25] Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol*, 24(30):4914–4921, Oct 2006.
- [26] Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66, 2006.
- [27] Loupakakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, Masi G, Graziano F, Cremolini C, Rulli E, Canestrari E, Funel N, Schiavon G, Petrini I, Magnani M, Tonini G, Campani D, Floriani I, Cascinu S, Falcone A. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 27:2622–2629, 2009.
- [28] Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 20(18 Suppl):1S–13S, Sep 2002.
- [29] Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*, 19(56):6550–6565, Dec 2000.
- [30] Moosmann N, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, Stauch M, Hass HG, Dietzfelbinger H, Oruzio D, Klein S, Zellmann K, Decker T, Schulze M, Abenhardt W, Puchtler G, Kappauf H, Mittermüller J, Haberl C, Schalhorn A, Jung A, Stintzing S, Heinemann V. Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with

- metastatic colorectal cancer: AIO KRK-0104—a randomized trial of the German AIO CRC study group. *J Clin Oncol*, 10:1050–8, 2011.
- [31] Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*, 6:279–86, 2005.
- [32] Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6(2):117–127, Aug 2004.
- [33] Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, Fujii H, Takeda Y, Dobashi Y. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Modern Pathology*, 17:895–904, 2004.
- [34] Razis E, Briasoulis E, Vrettou E, Skarlos DV, Papamichael D, Kostopoulos I, Samantas E, Xanthakis I, Bobos M, Galanidi E, Bai M, Gikonti I, Koukouma A, Kafiri G, Papakostas P, Kalogeras KT, Kosmidis P, Fountzilias G. Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: an exploratory study. *BMC Cancer*, 8:234, 2008.
- [35] Sakr RA, Barbashina V, Morrogh M, Chandarlapaty S, Andrade VP, Arroyo CD, Olvera N, King TA. Protocol for PTEN expression by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 18:371–374, 2010.
- [36] Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*, 22(7):1201–1208, Apr 2004.

- [37] Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, Siena S. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol*, 25:3238–3245, 2007.
- [38] Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, Akram M, Chung KY, Yao D, Paty PB, Gerald W, Chen B. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Modern Pathology*, 18:1350–1356, 2005.
- [39] Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*, 22(2):229–237, Jan 2004.
- [40] Twelves C; Xeloda Colorectal Cancer Group. Capecitabine as first-line treatment in colorectal cancer. Pooled data from two large, phase III trials. *Eur J Cancer*, 38 Suppl 2:15–20, Feb 2002.
- [41] Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland 2005-2006-Häufigkeiten und Trends*. Berlin, 2010.
- [42] Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D’Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 360(14):1408–1417, Apr 2009.
- [43] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319(9):525–532, Sep 1988.

- [44] Yacoub A, McKinstry R, Hinman D, Chung T, Dent P, Hagan MP. Epidermal growth factor and ionizing radiation up-regulate the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP prostate carcinoma through MAPK signaling. *Radiat Res*, 159(4):439–452, Apr 2003.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der EGFR-Signaltransduktion	4
3.1	Beispiel für Präparate in der HE-Färbung mit markiertem Tumoreal . . .	12
3.2	Real-Time PCR: Amplifikationskurven des eingesetzten Standards Abszisse: Anzahl der PCR-Zyklen; Ordinate: Stärke des Fluoreszenzsignals.	14
3.3	Real-Time PCR: Amplifikationskurven des Standards zusammen mit den untersuchten Tumorproben Abszisse: Anzahl der PCR-Zyklen; Ordinate: Stärke des Fluoreszenzsignals.	14
4.1	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation	24
4.2	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation . .	24
4.3	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A	25
4.4	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A	25
4.5	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B	26
4.6	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B	26
4.7	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population	27

4.8	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population	27
4.9	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population	27
4.10	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population	27
4.11	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation	28
4.12	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation . .	28
4.13	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A	29
4.14	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A	29
4.15	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B	29
4.16	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B	29
4.17	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population	31
4.18	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population	31
4.19	Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population	31
4.20	Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population	31
4.21	EGFR FISH: Beispiel für eine eusomes Areal im DAPI-Filter: Die meisten Zellkerne weisen zwei EGFR-Signale (grün) und zwei Zentromer-Signale (rot) auf	32
4.22	EGFR FISH: Präparat mit schwacher Polysomie im DAPI-Filter: <10% der Zellkerne haben ≥ 4 Gensignale (grün; Zentromer-Signal rot) . .	33
4.23	EGFR FISH: Präparat mit mittlerer Polysomie im DAPI-Filter: 10-40% der Zellkerne haben ≥ 4 Gensignale (grün; Zentromer-Signal rot) .	33

4.24 EGFR FISH: Präparat mit starker Polysomie im Dualbandfilter: $\geq 40\%$ der Zellkerne haben ≥ 4 Gensignale (grün; Zentromer-Signal rot) . . .	34
4.25 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation	35
4.26 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation . .	35
4.27 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A	36
4.28 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A	36
4.29 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B	36
4.30 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B	36
4.31 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population	37
4.32 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population	37
4.33 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population	38
4.34 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population	38
4.35 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation	39
4.36 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation . .	39
4.37 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm A	40
4.38 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm A	40
4.39 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Arm B	40
4.40 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Arm B	40

4.41 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-WT-Population	41
4.42 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-WT-Population	41
4.43 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der KRAS-MUT-Population	42
4.44 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der KRAS-MUT-Population	42
4.45 Fragmentlängenanalyse des Klons Nr. 40: Die meisten DNS-Fragmente haben eine Länge von 100 Basen (blaue Kurve). Diese Fragmentlänge wurde durch Vergleich mit dem Standardmarker LIZ [®] (gelbe Kurve) definiert. Es liegt nur ein maximaler Ausschlag vor, da beide Allele des Klons die gleiche Länge haben. Das Präpatat ist homozygot.	43
4.46 Beispiel für die Fragmentlängenanalyse eines heterozygoten Präparats: Die meisten DNS-Fragmente zeigten eine Länge von 100 und 110 Basen (blaue Kurve, Skalierung am oberen Rand). Diese Fragmentlängen wurde durch Vergleich mit dem Standardmarker LIZ [®] (gelbe Kurve) definiert. Es liegen zwei etwa gleich hohe maximale Ausschläge vor, weil die Allele des Klons zwei unterschiedliche Längen besitzen. Das Präparat ist heterozygot.	43
4.47 Sequenzierung des homozygoten Klons Nr. 40: Die bereits bekannte Fragmentlänge sind 100 Basen (siehe Abb. 4.45). Diese 100 Basen enthalten 17 CA-Wiederholungen (abzuzählen in der oberen Leiste). Analog enthält ein Fragment der Länge 110 Basen 5 CA-Wiederholungen mehr, also 22.	44
4.48 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation	45
4.49 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation	45
4.50 PTEN IHC: starke Rotfärbung → hohe Expression, 3 Punkte	46

4.51 PTEN IHC: mittlere Rotfärbung → mittlere Expression, 2 Punkte	46
4.52 PTEN IHC: schwache Rotfärbung → schwache Expression, 1 Punkt	46
4.53 PTEN IHC: keine Rotfärbung → keine Expression, 0 Punkte	46
4.54 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in der Gesamtpopulation	47
4.55 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in der Gesamtpopulation . .	47
4.56 ROC-Kurve für die ORR-P bei einem Cut-off von 50%	48
4.57 Kaplan-Meier Kurve für das progressionsfreie Überleben in Abhängigkeit von der ORR-P	49
4.58 Kaplan-Meier Kurve für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der ORR-P	49
7.1 Präparat Nr. 139 in der HE-Färbung und nach PTEN-IHC mit markiertem Tumoreal	85